



Etude de la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l' EBV suite au traitement par un HDACi, le vorinostat

Hazar Al Mohamad

► To cite this version:

Hazar Al Mohamad. Etude de la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l' EBV suite au traitement par un HDACi, le vorinostat. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0014 . tel-01332557

HAL Id: tel-01332557

<https://theses.hal.science/tel-01332557>

Submitted on 16 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Immunologie, Oncologie et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Hazar AL MOHAMAD

Le 10 Mai 2016

Etude de la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l'EBV suite au traitement par un HDACi, le vorinostat

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean Feuillard et le Dr Chantal Jayat-Vignoles

Soutenue devant le jury composé de :

Présidente :

Mme Joëlle Wiels

DR1 ; CNRS UMR 8126 ; Paris

Rapporteurs :

M. Henri Gruffat

CR1 ; INSERM U1111-CNRS UMR 5308 ; Lyon

Mme Raphaële Germi

MCU-PH ; CEA/CNRS UMR 5075 ; Grenoble

Examineurs :

M. Jean Feuillard

PU-PH ; CNRS UMR 7276 ; Limoges

Invités :

M. Nehman Makdissy

MCU, CSO Reviva ; Beyrouth-Liban

Mme Chantal Vignoles

MCU ; CNRS UMR 7276 ; Limoges

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Immunologie, Oncologie et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Hazar AL MOHAMAD

Le 10 Mai 2016

Etude de la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l'EBV suite au traitement par un HDACi, le vorinostat

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean Feuillard et le Dr Chantal Jayat-Vignoles

Soutenue devant le jury composé de :

Présidente :

Mme Joëlle Wiels

DR1 ; CNRS UMR 8126 ; Paris

Rapporteurs :

M. Henri Gruffat

CR1 ; INSERM U1111-CNRS UMR 5308 ; Lyon

Mme Raphaële Germi

MCU-PH ; CEA/CNRS UMR 5075 ; Grenoble

Examineurs :

M. Jean Feuillard

PU-PH ; CNRS UMR 7276 ; Limoges

Invités :

M. Nehman Makdissy

MCU, CSO Reviva ; Beyrouth-Liban

Mme Chantal Vignoles

MCU ; CNRS UMR 7276 ; Limoges

Quand mon bonheur serait recollé à la phrase « je suis fier de toi » de mon père et ma mère, j'aurai plus grand choix lorsque je décide de vivre une nouvelle aventure que de la prendre comme elle vient, au jour le jour, avec ses joies et ses peines, mais en essayant de toujours garder le sourire à ceux qui donnent un sens à cette vie.

A Mon père

A Ma mère

A mon amour

A Mes chères sœurs

A Mon frère

...

Remerciements

A ce moment d'arriver au bout de mon aventure de recherche et de vie, je suis tellement reconnaissante à chaque personne qui a contribué de près ou de loin à compléter ce travail, à me faire à la fin sentir le bonheur et la fierté d'arriver et à m'aider à garder le sourire de mes chers parents.

A l'équipe de Jean Feuillard :

Au professeur Jean Feuillard et à Chantal Jayat-Vignoles que de merci à dire. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueillie dans votre équipe. Merci de me rassurer et de me laisser sentir que tous va partir à la fin dans le bon sens. Merci de m'ouvrir l'opportunité de bien vivre les moments de recherche au sein de votre équipe. Merci de penser à moi pour les congrès nationaux et le congrès international. Merci d'être la vraie cause de mon arrivée à ce jour-là avec un cv plein d'expérience, de connaissances et des aventures. Merci et merci et merci et plein d'autres merci Jean et Chantal. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je n'oublierai jamais le proverbe préféré de Chantal « Never give up on your dreams ». Je vous souhaite plein de succès dans la vie puisque vous le méritez.

A Magalie Beckler, Racha Bahry, Oussama Taoui, merci de votre soutien moral dans les moments difficiles et de votre aide lorsque j'en avais besoin.

A Christelle Vincent Fabert, Nathalie Faumont, Nicolas Arnaud, Robin Jeannet, Héloïse Auclair, Emilie Lereclus et Valéria Dutan un grand merci pour votre accueil et votre gentillesse.

Aux membres du Jury :

A Monsieur Henri Gruffat, chargé de recherche première classe à Lyon (Inserm U1111 CNRS UMR 5308) et Madame Raphaël Germi, MCU-PH à Grenoble (UMR5075 CEA/CNRS), merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de m'avoir consacré de votre temps pour évaluer ce travail. Merci pour votre disponibilité.

A Madame Joëlle Wiels, Directrice de recherche à Paris (CNRS UMR 8126) et à Monsieur Nehman Makdissy, MCU, chief scientific officer et directeur du laboratoire Reviva au Liban merci de faire parti de ce jury en tant qu'examinateurs et invité et d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

A l'équipe de Michel Cogné :

Merci à tous les membres de l'équipe de Michel Cogné surtout à Christelle Oblet pour ses conseils en ce qui concerne le western blot, ils étaient vraiment précieux et à Nivine Srour pour sa disponibilité, son aide, son encouragement et son soutien dans les moments les plus bas de ma thèse, grand merci Nivine.

Les remerciements à cette équipe ne seront pas complets sans remercier la personne qui mérite plein et plein de remerciements. Pour toi Anne druïlle que de remerciement à dire. Merci pour ta gentillesse, ton humanité et ta tendresse. Tout simplement merci pour la personne que tu es. Grand merci Anne.

A mes amis :

A mes amis en France, Souha El Jawhary, Mustafa El jawhari, Mohamad Hussein El Jawhari et Rafik Ghezali. Je ne vous oublierai jamais. Merci pour les bons moments que nous avons passé ensemble, pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre pensée à moi, votre soutien moral dans les moments les plus difficiles de ma thèse et votre aide lorsque j'en avais besoin. Merci beaucoup chers sœurs et frères. Vous m'avez vraiment rendu ma vie en France comme s'il c'était à côté de mes parents.

A mes 2 plus anciennes amies, Ghina El Mir et Azza Dib, je ne peux jamais oublier de vous remercier à chaque étape de ma vie. Merci pour votre vraie amitié, votre disponibilité, votre soutien moral et pour chaque bon moment que nous avons passé ensemble. Je suis vraiment reconnaissante d'arriver à un moment où je peux présenter des amies comme des sœurs. Merci chères sœurs.

A mes parents :

Ces remerciements ne seront jamais complets sans aller plus loin, aux autres bouts du monde, au Liban et en Amérique, vers les plus proches, vers mes parents.

C'était pour vous et à vous mes chers papa et maman que je voulais toujours arriver. Je vous dédie votre travail de 27 ans. Ils n'étaient pas perdus. Vous avez pu faire le **docteur**
Hazar Khaled Al MOHAMAD.

À vous papa et maman, à mes sœurs Hanady et Dima, à mon frère Hany, à ma grand mère Amneh et ma tante Hana El Mustapha, un grand merci d'être toujours à côté de moi, de me soutenir quand j'avais besoin et de me donner l'amour du monde qui m'a toujours poussé à supporter tout pour arriver à ce que je voulais.

À mon oncle Chaker El Mustapha j'aimerais bien te dire que c'est à cause de toi que je suis aujourd'hui là. Merci d'être toujours mon exemple de l'homme qui est arrivé, merci de me renforcer toujours. Merci pour le grand amour que tu m'as consacré. Cher oncle merci d'être toujours, même de loin, à côté de moi. Je t'aime beaucoup.

À toi Abou el Omaren, merci pour tout l'amour que tu m'as donné, j'en avais vraiment besoin lors de la thèse. Merci d'ajouter à ma vie une nouvelle expérience de vie, la vie des fiancés. Merci pour ta tendresse et ta gentillesse. Grand merci Omar.

À mes futurs beaux-parents, qui m'ont accueilli au sein de leur famille. Merci pour votre soutien et votre gentillesse. Oncle Hassan El Ashi, tante Dalal, Alaa, Ghazal, Osman, Souraya, Amina, Alaa et la petite Mia grand merci.



Sommaire

Liste des figures	i
Liste des tableaux.....	ii
Abréviations	iii
avant-propos	1
introduction bibliographique.....	3
<u>Partie 1</u> : Persistance du virus d'Epstein Barr : un équilibre entre latence et réactivation.	4
I. Généralités sur le virus d'Epstein Barr (EBV)	4
I. 1) Historique et pathologies associées à l'EBV.....	4
I. 1. 1) Historique.....	4
I. 1. 2) Pathologies liées à l'EBV	5
I. 2) Epidémiologie du virus	8
I. 2. 1) Répartition géographique	8
I. 2. 2) Age et séroprévalence.....	10
I. 2. 3) Sexe et séroprévalence	10
I. 2. 4) Transmission de l'EBV	11
I. 3) Classification, structure et génome de l'EBV	11
I. 3. 1) Classification du virus.....	11
I. 3. 2) Structure du virion	13
I. 3. 3) Génome de l'EBV	14
II. Infection et persistance virale.....	16
II. 1) Infection et cellules cibles	16
II. 1. 1) Cellules épithéliales.....	17
II. 1. 2) Lymphocytes B	18
II. 1. 3) Lymphocytes T et NK.....	20

II. 2) Persistance virale.....	21
II. 2. 1) Cycle de l'EBV.....	22
III. Latence virale.....	26
III. 1) Les différents types de latence	27
III. 2) Les ARN de latence.....	28
III. 3) Les protéines nucléaires de latence	30
III. 4) Les protéines membranaires de latence	34
IV. Réactivation de l'EBV.....	36
IV. 1) Réactivation et cycle lytique	36
IV. 1. 1) Réactivation naturelle de l'EBV	37
IV. 1. 2) Induction de la réactivation de l'EBV <i>in vitro</i>	37
IV. 1. 3) Réplication productive et cycle lytique	38
IV. 2) Gènes et protéines du cycle lytique productif.....	40
IV. 2. 1) Identification et caractérisation des gènes et protéines très précoces	40
IV. 2. 1. 1) ZEBRA.....	42
IV. 2. 1. 2) Rta	45
IV. 2. 2) Régulation de l'expression du gène très précoce <i>BZLF1</i>	47
IV. 2. 2. 1) Promoteur de <i>BZLF1</i>	47
IV. 2. 2. 2) Facteurs contribuant à la réactivation de l'EBV dans les cellules épithéliales	48
IV. 2. 2. 3) Facteurs contribuant à la réactivation de l'EBV lors de la différenciation plasmocytaire	49
IV. 2. 2. 4) Facteurs de transcription inhibant la transcription de <i>BZLF1</i>	51
IV. 2. 2. 5) Facteurs de transcription induisant la transcription de <i>BZLF1</i>	55
IV. 2. 3) Régulation de l'expression de gène très précoce <i>BRLF1</i>	57
IV. 2. 4) Gènes et protéines précoces, amplification du génome viral	58

IV. 2. 5) Gènes et protéines tardives, production des particules virales.....	61
<u>Partie 2 :</u> Le vorinostat : un inhibiteur des HDAC, inducteur de l'apoptose et de la réactivation de l'EBV	67
I. Les Histones déacétylases (HDAC)	67
I. 1) Chromatine et HDAC	67
I. 1. 1) Organisation chromatinienne.....	67
I. 1. 2) Code des histones	69
I. 2) Modifications post-traductionnelles par acétylation/désacétylation	71
I. 2. 1) Acétylation	71
I. 2. 1. 1) Les HATs.....	71
I. 2. 1. 2) Rôles de l'acétylation des histones	72
I. 2. 2) Déacétylation	73
I. 2. 2. 1) Les HDACs.....	73
I. 2. 2. 2) Mécanisme d'action des HDACs	75
I. 2. 2. 3) Régulation de l'activité des HDACs.....	76
I. 3) Acétylation/désacétylation et dynamisme de la chromatine.....	76
I. 3. 1) Acétylation/désacétylation des protéines non-histoniques	77
II. Inhibiteurs des HDAC (HDACi), exemple du vorinostat	78
II. 1) Inhibiteurs des HDAC.....	78
II. 1. 1) Classes des HDACi.....	78
II. 2) Mécanisme d'action des HDACi.....	81
II. 3) HDACi et cancer	83
II. 3. 1) Rôle anti-tumoral des HDACi	83
II. 3. 2) Spécificité des HDACi pour les cellules tumorales.....	85
II. 4) Vorinostat et traitement des cancers	86
II. 4. 1) Le Vorinostat, un puissant HDACi	86
II. 4. 2) Activité antitumorale <i>in vitro</i>	87

II. 4. 3)	Activité antitumorale <i>in vivo</i>	88
II. 4. 4)	Influence sur la signalisation cellulaire	89
III.	HDACi et apoptose.....	92
III. 1)	Apoptose cellulaire	92
III. 1. 1)	Généralités.....	92
III. 1. 2)	Apoptose indépendante des caspases	93
III. 1. 3)	Apoptose extrinsèque dépendante des caspases.....	94
III. 1. 4)	Apoptose intrinsèque dépendante des caspases	96
III. 1. 4. 1)	Protéines de la famille Bcl2	96
III. 1. 4. 2)	Perméabilisation de la membrane mitochondriale et apoptosome.....	98
III. 1. 4. 3)	Reticulum endoplasmique et apoptose intrinsèque	101
III. 1. 5)	Caspases.....	101
III. 1. 6)	Apoptose et voie P38 MAPK.....	103
III. 2)	Voies de signalisation impliquée dans l'apoptose induite par les HDACi	107
III. 2. 1)	Voie extrinsèque.....	108
III. 2. 2)	Voie intrinsèque	109
III. 2. 3)	Mécanismes alternatifs de la mort par apoptose.....	111
III. 2. 3. 1)	Substrats des HDACi	111
III. 2. 3. 2)	Espèces oxygénées réactives.....	114
III. 2. 3. 3)	p21, régulateur du cycle cellulaire	115
IV.	HDACi et initiation de la réactivation de l'EBV.....	116
IV. 1)	Promoteur de <i>BZLF1</i> , réactivation et MEF2	116
IV. 2)	Rôle du Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2).....	118
IV. 2. 1)	Famille des protéines MEF2.....	118
IV. 2. 2)	Structure et localisation des protéines MEF2.....	118

IV. 2. 3) Signalisation de MEF2 et HDAC II	120
V. HDACi et autres virus.....	121
Objectif de la publication.....	124
publication :	126
Pp38 modulates the apoptotic/reactivation balance following EBV infected B cells treatment by the histone deacetylase inhibitor vorinostat	126
conclusions, discussion et perspectives	157
références bibliographiques.....	167

Liste des figures

Figure 1 : Virions de l'EBV visualisés en microscopie électronique au sein de cellules d'une lignée lymphoblastoïde.....	5
Figure 2 : Arbre de classification des huit différents Herpèsvirus humains.....	12
Figure 3 : Structure du virion de l'EBV	14
Figure 4 : Organisation du génome de l'EBV sous sa forme linéaire (A) et épisomique (B) de 172 kb.....	16
Figure 5 : Pénétration de l'EBV dans les cellules Détroit-562 ^{sort} épithéliales polarisées et propagation intercellulaire.....	18
Figure 6 : Attachement de l'EBV aux lymphocytes B	20
Figure 7 : Les trois différentes phases du mode de vie de l'EBV	25
Figure 8 : Cycle de l'EBV chez des porteurs sains.....	26
Figure 9 : Schéma représentant le profil de transcription des gènes viraux en fonction des différents types de latence	28
Figure 10 : Altération de l'expression de certaines protéines, de cytokines et de chimiokines dans différents types cellulaires par les miRNA de l'EBV	30
Figure 11 : Le cycle de vie biphasique de l'EBV	37
Figure 12 : Induction <i>in vitro</i> du cycle productif de l'EBV par divers agents	38
Figure 13 : Représentation schématique du processus d'assemblage et de relargage du virion. Les précurseurs de capsides (pc) s'assemblent dans le noyau	39
Figure 14 : Localisation des gènes <i>BZLF1</i> et <i>BRLF1</i> dans la structure schématisée linéaire et épisomique de l'organisation du génome de l'EBV et structure des ARNm produits dans la région <i>BZLF1/BRLF1</i>	42
Figure 15 : Localisation du gène <i>BZLF1</i> et structure de sa protéine	43
Figure 16 : Structure schématique de la protéine Rta	46
Figure 17 : Représentation schématique du promoteur Z de <i>BZLF1</i>	48
Figure 18 : Induction de la réactivation d'EBV lors de la différenciation plasmocytaire.	51
Figure 19 : Représentation schématique du promoteur Zp de <i>BZLF1</i> et des facteurs cellulaires modulant l'expression de ZEBRA.....	52
Figure 20 : Représentation schématique du promoteur R de <i>BRLF1</i>	58
Figure 21 : Représentation schématique de l'origine de réplication OriLyt.....	61
Figure 22 : Organisation de l'information génétique sous forme de chromatine	69
Figure 23 : Représentation schématique des histones et de leur acétylation.....	72
Figure 24 : Représentation schématique des différentes classes d'enzymes HDAC.....	75
Figure 25 : Rôle des HDACs et des HATs dans l'acétylation des histones et la transcription des gènes	76
Figure 26 : Les différents complexes impliquant les HDACs	77
Figure 27 : Les cinq différentes classes des HDACi et la structure chimique des molécules représentatives	79
Figure 28 : Mécanismes d'induction de la mort cellulaire par les HDACi.....	83
Figure 29 : Structure chimique du vorinostat (ou SAHA) et insertion dans la poche contenant le site catalytique des HDAC	87

Figure 30 : Mécanisme d'action proposé pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules tumorales par le vorinostat.....	90
Figure 31 : Voie apoptotique caspase-indépendante.....	94
Figure 32 : Récepteurs de mort.....	96
Figure 33 : Structure des molécules de la famille Bcl2.....	98
Figure 34 : Schématisation de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par Bax et Bak et de la formation de l'apoptosome	100
Figure 35 : Structure générale des caspases	103
Figure 36 : Principe de l'activation des caspases initiatrices et effectrices.	103
Figure 37 : Les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par p38 α	107
Figure 38 : Modèle du contrôle de l'expression du gène <i>BZLF1</i>	117
Figure 39 : Organisation des domaines des MEF2 chez l'homme et comparaison des séquences des protéines.....	119
Figure 40 : MEF2 est un régulateur central de l'expression de nombreux gènes cibles.	121

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales pathologies associés à l'EBV.	6
Tableau 2 : Répartition géographique des géotypes types 1 (EBV1) et 2 (EBV2), en fonction de diverses pathologies	10
Tableau 3 : Gènes précoces du cycle lytique de l'EBV selon la classification EA-D/EA-R et fonction des protéines qu'ils codent.	59
Tableau 4 : principaux gènes et protéines tardives du cycle lytique de l'EBV et leurs fonctions.	63
Tableau 5 : Les différentes classes de HDAC et leurs inhibiteurs chimiques de type HDACi.	81
Tableau 6 : Différents types des cellules tumorales dont la prolifération est inhibée <i>in vitro</i> par le vorinostat.	88
Tableau 7 : Traitements employés en combinaison avec le vorinostat pour potentialiser son effet anti-cancéreux.	92
Tableau 8 : Les trois groupes de caspases initiatrices, effectrices et inflammatoires.	102

Abréviations

5-FU	5-fluorouracile
aa	acides aminés
ADN	acide désoxyribonucléotide
AG	appareil de Golgi
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AP-1	activator protein 1
AR	récepteurs à l'androgène
ART	ADP-ribosyltransferases
ASK1	Apoptosis Signaling Kinase 1
ATF	activating transcription factor
BA	acide butyrique
Bak	Bcl-2 antagonist or killer
BARTs	BamH1-A rightward transcripts
Bax	Bcl-2- associated X protein
BCL6	B-cell lymphoma 6
BCR	B cell receptor
BH	Bcl2 Homology domain 3
Bim	Bcl-2-Interacting Mediator of cell death
BL	Lymphome de Burkitt
BLIMP-1	B lymphocyte-induced maturation protéine-1
bZIP	basique/leucine Zipper
c-FLIP	FLICE-like inhibitory protein
CARD	caspase recrutement domain
CI994	<i>p</i> -N-acétyl-dinaline
CMH	Complexe majeurs d'histocompatibilité
CRE	CREB-responsive element
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
DD	Death Domain
DED	Death effector domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DR	Death Receptor
E2-2	protéine de liaison à boîte E
EBERs	Epstein-Barr Encoded small RNAs
EBF1	Early B-Cell Factor 1
EBNAs	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBV	Epstein Barr Virus
EDAR	EctoDysplasine A1 Receptor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EKLF	Erythroid Krüppel-like factor
ER	reticulum endoplasmique
FADD	Fas Associated Death Domain
FasL	Fas ligand
FK-228	depsipeptide
GSH	Glutathion

HAT	histones acétyltransférases
HDAC	Histone désacétylase
HDACi	Inibiteurs des histones déacétylases
HDLP	HDAC-like protein
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor- 1 α
Hsp	Heat Shock Protein
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated DNase
IFN	Interferon
Il	Interleukine
IR	internal repeat
JNK	Janus N-terminal Kinase
KO	Knockout
LAM	Leucémie aigue myéloïde
LBH589	<i>panobinostat</i>
LCL	lignée cellulaire lymphoblastoïde
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMP	Latent Membrane Protein
MA	membran antigen
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MMP10	matrice métalloprotéinase 10
MnTBAP	Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin
MS275	entinostat
MTA2	metastasis-associated 2
N-CoR	nuclear receptor co-repressor
NAC	N-acétyl cystéine
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NF-Y	nuclear factor Y
NLS	signal de localisation nucléaire
NO	oxyde nitrique
NOK	EBV-infected telomerase-immortalized normal oral keratinocytes
NPC	non à petites cellules
OCT2	octamer-binding protein 2
Orilyt	origine de réplication lytique
Orip	origine de réplication de latence
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PAX5	Paired Box 5
pb	paire de base
PCID1	PCI domain-containing protein 1
PKC	protéine kinase C
PXD 101	<i>Belinostat</i>
Rb	Rétinoblastome
RbAp46/48	Retinoblastoma protein associated protein 46/48
RIP1	RIPK1, Receptor-Interacting Protein Kinase 1
RNAi	ARN inteference

ROS	Reactive Oxygen Species
RRE	R response element
SAHA	Acide subéryloylanilide hydroxamique
SBE	Smads-responsive element
SIPs	Smad-interacting proteins
Sir-2	silent information regulator 2
SIRT	sirtuin
sirtuines	silent information regulator 2 (Sir-2)-related protein
Smad7	Mothers against decapentaplegic homolog 7
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
TAD	domaine d'activation de la transcription
tBid	truncated Bid
TBP-2	Trx Binding Protein-2
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR-1	récepteur au TNF
TPA	12-O-Tétradecanoyl Phorbol-13-Acétate
TR	terminal repeat
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factors
TRAIL	Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSA	trichostatine A
TSA	Trichostatine A
U	unique region
VCA	Viral Capside Antigène
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XBP-1	X-box-binding protein 1
yHDA1	<i>yeast Histone Deacetylase-A1</i>
yRPD3	<i>yeast Reduced Potassium Dependency 3</i>
ySIR2	<i>yeast Silent Information Regulator 2</i>
YY1	ying yang 1
ZEBs	Zinc E-box Binding factor
Zp	promoteur BZLF1
ZRE	Z response element

AVANT-PROPOS

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un gamma herpès virus qui infecte plus de 90% de la population adulte dans le monde. La primo-infection peut être la cause d'une mononucléose infectieuse mais est généralement asymptomatique. Le virus se transmet par la salive et suite à la primo-infection il persiste dans l'organisme de manière latente tout au long de la vie de l'individu, niché au sein du compartiment B mémoire. Sporadiquement, le virus peut entrer en cycle lytique, ce qui conduit à la libération de nouveaux virions et permet sa persistance au sein de l'organisme, de même que sa transmission inter-individus.

L'infection par l'EBV est essentiellement de type latent. Son cycle de vie nécessite toutefois l'alternance de phases de latence et de réactivation, la commutation entre ses deux états constituant un processus important de la survie du virus.

Par ailleurs, l'EBV est associé à différents désordres hématologiques dont certains lymphomes de type B, comme le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin ou des lymphomes liés à des déficits immunitaires innés ou acquis.

Les inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC) sont des molécules prometteuses pour le traitement des cancers car ils sont capables d'induire le processus d'apoptose. Ils sont notamment proposés pour le traitement des lymphomes. Cependant, certains iHDAC, tels que le vorinostat, sont également des réactivateurs potentiels du virus. Ceci pose la question du devenir des cellules B en latence de l'EBV lors de traitements chimio thérapeutiques incluant des iHDAC.

Notre travail de thèse porte sur l'étude de l'effet du vorinostat lors du traitement de lymphocytes B tumoraux infectés par l'EBV de manière latente. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux processus de réactivation et d'apoptose. Nous souhaitons ainsi améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors des premiers stades de la réactivation ainsi que préciser l'effet du vorinostat lors des traitements.

L'introduction bibliographique est divisée en deux grandes parties. La première porte sur les caractéristiques générales sur le virus, la latence virale et la réactivation de l'EBV. Dans la seconde partie nous nous focalisons sur le vorinostat en tant qu'iHDAC inducteur de l'apoptose et de la réactivation de l'EBV. Nous présentons par la suite sous forme de publication les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet du traitement par le vorinostat de cellules B tumorales en latence de l'EBV. Une discussion ainsi que des propositions de perspectives au travail sont abordées en fin de document.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Persistance du virus d'Epstein Barr : un équilibre entre latence et réactivation.

I. Généralités sur le virus d'Epstein Barr (EBV)

I. 1) Historique et pathologies associées à l'EBV

I. 1. 1) Historique

La découverte de l'EBV fait partie des grandes histoires de la recherche médicale du XX^e siècle (Young and Murray, 2003) (Tselis, 2013).

La mononucléose infectieuse (MI) a été définie en 1920 par Sprunt et Evans comme un sous-ensemble de pharyngites fébriles avec adénopathies cervicales, ayant la spécificité de présenter un nombre élevé de cellules mononuclées en périphérie. En 1932, Paul et Bunnell ont confirmé l'observation de Haganutziu et Deicher montrant qu'au cours de la maladie apparaissent des agglutinines hétérophiles (anticorps IgM dirigés contre des globules rouges animaux) conduisant à l'agglutination des globules rouges de moutons. Un test diagnostic sérologique de la MI basé sur ce même principe est encore employé de nos jours (réaction de Paul-Bunell-Davidsohn). Puis il a fallu attendre plusieurs décennies pour que de nouvelles avancées aient lieu, les tentatives de transmission de la MI entre individus ou à des animaux ayant donné des résultats difficiles à interpréter.

En 1958, un chirurgien colonial britannique, Denis Burkitt, de retour d'un séjour en Ouganda rapporte l'existence d'un lymphome endémique du sinus maxillaire chez de jeunes enfants africains : le lymphome de Burkitt (Burkitt Lymphoma : BL). La distribution géographique de ce lymphome est chevauchante avec plusieurs autres maladies transmissibles, ce qui suggère la possibilité d'une pathologie de même genre.

L'hypothèse d'une transmission virale, conduit Anthony Epstein (virologue intéressé par les virus oncogènes) et son étudiante Yvonne Barr à tenter l'isolement d'un virus à partir d'échantillons de tumeurs de Burkitt. Cette expérimentation est infructueuse. Par contre, alors qu'aucune culture de cellules lymphocytaires n'a pu être menée avec succès, les deux chercheurs montrent en 1964 qu'il est possible de maintenir en prolifération des lymphocytes de lymphomes de Burkitt. Ils isolent et observent en microscopie électronique un virus morphologiquement similaire aux herpesvirus à partir de ces cultures : le **virus d'Epstein**

Barr (Epstein Barr Virus : EBV). Il s'agit du premier exemple d'une pathologie virale à l'origine d'un cancer humain.

Le virus ne peut être mis en culture, aussi des échantillons de tumeurs sont envoyés au laboratoire de Werner et Gertrude Henle pour le caractériser de manière plus précise (**Figure 1**). En 1966, Henle constate que ce virus est antigéniquement différent des autres herpesvirus et que les anticorps anti-EBV sont fréquemment retrouvés au sein de la population mondiale (environ 90 % de la population mondiale est identifiée comme possédant ces anticorps). La première connexion entre la MI et l'EBV est faite lorsqu'un technicien séronégatif du laboratoire d'Henle développe la maladie, tandis que son sérum devient fortement séropositif et que ses lymphocytes acquièrent la capacité de se multiplier *in vitro*. En 1968, Niederman établit le rôle étiologique de l'EBV dans la MI.

Le rôle de l'EBV a par la suite été associé à un certain nombre de tumeurs (lymphome de Burkitt, différents lymphomes des cellules B et T, lymphome de Hodgkin...). Les lymphomes systémiques "opportunistes" dans le contexte de la transplantation, d'immunodéficiences acquises (VIH en particulier) et de la chimiothérapie sont également souvent associés à l'EBV.

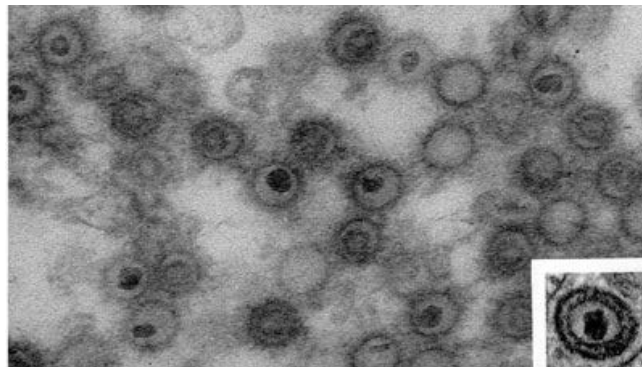


Figure 1 : Virions de l'EBV visualisés en microscopie électronique au sein de cellules d'une lignée lymphoblastoïde. Les virions matures délimités par deux membranes renferment un nucléoïde dense tandis que les virions immatures sont entourés d'une seule membrane. Dans l'encart on voit une particule virale mature de 115 nm de diamètre environ (d'après Epstein, 2012) (microphotographie reprise de travaux d'Epstein et Barr).

I. 1. 2) Pathologies liées à l'EBV

Dans l'histoire de la médecine, l'EBV restera le premier virus humain à être associé à des

cancers (Carbone et al., 2008) (Tse and Kwong, 2015). Il a été impliqué dans une large variété de maladies, à la fois bénignes et malignes, d'origine épithéliale ou lymphoïde (B, T ou NK), aussi bien chez l'hôte immunodéprimé qu'immunocompétent. Les principales pathologies associées à l'EBV sont présentées dans le **tableau 1**. L'expression des protéines virales dans les tissus infectés conduit à des altérations cellulaires qui contribuent à ces pathologies. Le lien est évoqué lorsqu'on retrouve le virus à l'état clonal dans la plupart des cellules tumorales. Cependant le rôle joué par le virus dans le déclenchement et l'évolution de ces pathologies reste mal connu. Ce virus est responsable de la MI et est associé à divers cancers.

Tableau 1 : Principales pathologies associées à l'EBV.

Pathologies	Association à l'EBV (%)
Lymphome de Burkitt endémique (Afrique)	~95
Lymphome de Burkitt non-endémique	20 à 30
Lymphome de Hodgkin	50 à 70
Lymphome B immunoblastique (associé au VIH)	~95
Lymphome B des sujets transplantés	~95
Lymphome B lié à l'X (syndrome de Purtillo)	~95
Lymphome T périphérique	~40
Lymphome T/NK nasal extranodal	~95
Carcinome du rinopharynx	~95
Carcinome gastrique	~10

Les infections primaires à EBV pendant l'enfance sont ubiquitaires (environ 90 % des individus adultes présentent des anticorps anti-EBV) et en majorité asymptomatiques ; elles sont d'autant plus précoces que les conditions d'hygiène sont précaires. Par contre, une exposition primaire tardive chez l'adolescent ou l'adulte jeune, comme dans les pays développés, est souvent symptomatique et peut aboutir dans 50% des cas au développement d'une mononucléose infectieuse. Il s'agit d'une pathologie lymphoproliférative détectée après une période d'incubation de quelques semaines et caractérisée par des maux de gorges, de la fièvre, une adénopathie, une splénomégalie, une prolifération polyclonale des lymphocytes B

infectés suivie de l'apparition de grandes cellules T cytotoxiques spécifiques de l'EBV. Le titre viral est élevé dans les prélèvements au niveau de la gorge et de la salive, indiquant une réplication virale active (Gerber et al., 1972).

L'EBV est associé à diverses lymphopathologies : lymphome B (lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin), Lymphomes T et lymphomes NK (d'Amore et al., 1996) (Flavell and Murray, 2000) (Naresh et al., 2000) (Brink et al., 2000) (Carbone et al., 2008).

Mes travaux de thèse portent en partie sur des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt infectées ou non par l'EBV. Le lymphome de Burkitt (BL) se caractérise par une prolifération monoclonale de lymphocytes B, responsable de manifestations cliniques variées comme des tumeurs de la mâchoire, des intestins et plus rarement des ovaires, des reins ou des seins. Il s'agit d'une forme rare de lymphome malin non-Hodgkinien à cellules B matures, de haut grade. Histologiquement, il est constitué d'un infiltrat diffus et monomorphe de cellules lymphoïdes atypiques très prolifératives et de nombreux histiocytes phagocytaires, donnant l'aspect de ciel étoilé lors de l'observation en microscopie. Il existe trois formes de ce lymphome : la forme endémique, la forme sporadique et le BL des immunodéprimés. La **forme endémique** est la première reconnue et décrite par Denis Burkitt. Elle est géographiquement localisée aux régions d'Afrique équatoriale et de la Papouasie Nouvelle-Guinée ; il y a infection des cellules tumorales par l'EBV dans 100% des cas. La **forme sporadique**, surtout rencontrée chez les enfants et les jeunes adultes, ne présente pas de distribution géographique particulière et est associée à l'EBV dans 15 à 30% des cas (Hecht and Aster, 2000). Quant aux **BL des immunodéprimés** (se traduisant par une baisse des CD4 chez les patients VIH séropositifs), l'association à l'EBV est plus fréquente (30 à 40 % des cas) (Young and Rickinson, 2004) (Carbone et al., 2008).

Une translocation chromosomique t(8;14), ou moins fréquemment t(8;2) ou t(8;22) a été observée lors d'une étude cytogénétique sur les cellules tumorales des lymphomes de Burkitt. Il y a juxtaposition du protooncogène c-myc (situé en 8q24) avec les gènes codant pour les immunoglobulines (chaîne lourde en 14q32, chaîne légère kappa en 2p11.2 ou chaîne légère lambda 22q11). Les cellules entrent en prolifération suite à la dérégulation de l'expression de c-Myc, qui active les voies anti-apoptotiques. Ces translocations surviennent au niveau de régions qui subissent des cassures chromosomiques lors de la maturation lymphocytaire (Hecht and Aster, 2000). Ils sont le résultat d'erreurs survenant durant le développement normal des cellules B.

Le potentiel oncogénique de l'EBV dans ces lymphomes a pu être mis en évidence *in vitro*. En effet, les cellules de la lignée Akata, dérivée d'un lymphome de Burkitt (Shimizu et al., 1996), perdent certaines caractéristiques telles que leur tumorigénicité chez les souris SCID et sont moins résistantes à l'apoptose (Komano et al., 1998), comparativement à la même lignée infectée par l'EBV. Ces propriétés sont restituées après infection par l'EBV, démontrant ainsi son rôle d'oncogène (Sheng et al., 2003).

Chez les sujets immunodéprimés, tels que les malades du SIDA et les receveurs de greffes d'organes, l'EBV est associé à des lymphomes (Pallesen et al., 1991) (van Baarle et al., 2001) (Moriuchi and Moriuchi, 2003) (Macswen and Crawford, 2003). Les maladies lymphoprolifératives post-transplantations (PTLD, Post Transplantation Lymphoproliferative Disorders), sont associées dans environ 95% des cas à l'EBV, et vont d'hyperplasies bénignes à des lymphomes agressifs (Evens et al., 2010). Le risque pour les individus séro-négatifs est la greffe d'un organe provenant d'un individu séro-positifs (Paya et al., 1999). Ces pathologies ont généralement pour origine des cellules B (Draoua et al., 2004). Elles résultent de leur transformation par l'EBV, associée à une détérioration de la réponse immunitaire anti-EBV.

L'EBV est également associé à diverses épithéliopathologies : comme des carcinomes du nasopharynx, des carcinomes gastriques ou des carcinomes de type lympho-épithélial (IARC Monographs, 1997) (Hsu and Glaser, 2000) (Dolcetti and Menezes, 2003) (Hjalgrim et al., 2007) (Sousa et al., 2008).

I. 2) Epidémiologie du virus

Dans le monde, plus de 95% des individus sont infectés par l'EBV. Ce virus est phylogénétiquement ancien et a probablement coévolué avec l'homme au cours des 90-100 millions dernières années. De même que toutes les autres herpes virus humains, il persiste à vie dans l'organisme après la primo-infection.

I. 2. 1) Répartition géographique

L'EBV est devenu ubiquitaire dans toutes les populations humaines dans la mesure où, suite à l'infection primaire, il est capable de persister à vie à l'état de latence avec des périodes de réactivation épisodiques et peut être transmis par la salive.

L'EBV est détecté chez tous les types de populations et dans toutes les régions du monde,

avec une variation géographique dans la distribution de deux génotypes différents : le génotype 1 (EBV1) et le génotype 2 (EBV2). Ces derniers diffèrent dans l'organisation des gènes codants pour certaines protéines de latence virales. Le génotype EBV1 est le plus répandu. Il a été identifié en Europe, en Amérique et en Asie et dans 85% des cas de carcinomes du nasopharynx. L'EBV2 transforme les cellules B avec un rendement plus faible. Il est présent en Afrique centrale, en Afrique équatoriale (comme en Nouvelle Guinée, où il est retrouvé dans plus de 90% des lymphomes de Burkitt) et en Alaska (**Tableau 2**) (Zimber et al., 1986) (Gratama and Ernberg, 1995). Il ne semble y avoir aucune relation entre un génotype donné de l'EBV et une maladie spécifique associée. La répartition géographique spécifique de tumeurs malignes associées à l'EBV, comme le LB (en Afrique) et le carcinome du nasopharynx (en Asie), n'est probablement pas due à des différences de génotype mais plutôt à l'activation de la réplication virale par des cofacteurs supplémentaires (Young, 2008). Les deux sous-types de l'EBV sont retrouvés chez les patients immunodéprimés (Borisch et al., 1992) (Thompson, 2004). Cependant, selon certains auteurs, L'EBV2 est rare dans la plupart des zones d'étude mais essentiellement retrouvé chez les sujets immunodéprimés comme les personnes HIV séropositives ou greffées. Une exposition prolongée au virus, accompagnée d'une déficience immunitaire, pourrait conduire à la transmission de plusieurs génotypes (Gratama and Ernberg, 1995). Par contre, selon d'autres auteurs, la fréquence du génotype 2 chez les sujets HIV séropositifs semble comparable à celle des individus sains, suggérant que l'immunodéficience ne serait pas responsable de l'augmentation de la fréquence de l'EBV2 (Yao et al., 1998).

Tableau 2 : Répartition géographique des géotypes types 1 (EBV1) et 2 (EBV2), en fonction de diverses pathologies (d'après Hjalgrim, 2007).

Pays	Patients	N	Type 1 ou A (%)	Type 2 ou B (%)	2 types (%)
China (Hu et al., 1991)	carcinome du nasopharynx	37	86	14	0
Taiwan (Shu et al., 1992)	carcinome du nasopharynx	53	94	4	2
Korea (Kim et al., 2002)	sains	26	81	15	4
Japan (Kunimoto et al., 1992)	sains	21	95	5	0
USA (Frank et al., 1995)	Post-transplant lymphoproliferative disease	24	100	0	0
USA (Goldschmidts et al., 1992)	HIV-positive	22	55	45	0
Alaska (Abdel-Hamid et al., 1992)	carcinome du nasopharynx	3	0	100	0
Argentina (Correa et al., 2004)	sains	183	78	15	7
Brasil (Klumb et al., 2004)	lymphome de Burkitt	21	86	14	0
Central Africa (Goldschmidts et al., 1992)	lymphome de Burkitt	16	50	50	0
Papua New Guinea (Aitken et al., 1994)	lymphome de Burkitt	56	42	53	5
Western Europe (Sandvej et al., 1994)	Lymphome de hodgkin	55	93	5	1
Australia (Kyaw et al., 1992)	HIV-positive	56	27	30	43
Australia (Kyaw et al., 1992)	transplantation cardiaque	18	39	33	28

I. 2. 2) Age et séroprévalence

La séroprévalence de l'EBV est fonction de l'âge, du status socioéconomique et de l'ethnie. Dans les pays non industrialisés, plus de 95% des jeunes enfants sont infectés par l'EBV alors que dans les pays industrialisés la primo-infection est nettement plus tardive. Dans un pays non industrialisé, tel que l'Ouganda, 80% des enfants sont estimés comme étant séropositifs pour l'EBV à l'âge d'un an (Kafuko et al., 1972). Par contre, dans un pays industrialisé comme les Etats-Unis, environ 40% des enfants de 5 ans sont séropositifs pour l'EBV au sein de la population blanche, ce pourcentage augmente à 55% à 14 ans et à pratiquement 80% à 19 ans. Généralement, une primo-infection par l'EBV chez les enfants de moins de 5 ans ne donne pas de MI. L'incidence de la MI est à son maximum chez les jeunes de 15 à 25 ans et la séroprévalence de l'EBV est telle qu'après 30 ans il est rarement observé d'infections aiguës à l'EBV provoquant une MI. Chez les individus infectés il existe des réactivations périodiques et des réinfections tout au long de la vie, généralement sans signe clinique.

I. 2. 3) Sexe et séroprévalence

Chez les jeunes enfants, Il n'y a pas de différence de séroprévalence à l'EBV en fonction du

sexe (Lang et al., 1977). Cette similitude est retrouvée en tout début de l'adolescence dans les pays développés mais une séroprévalence plus élevée est observée par la suite chez les filles, avec une apparition plus précoce de la mononucléose infectieuse, indiquant une exposition antérieure au virus (Crawford et al., 2002).

Par ailleurs, de même que pour les autres virus, les titres d'anticorps contre l'EBV et les autres virus semblent être plus élevés chez les femmes que chez les hommes (Wagner et al., 1994), Ceci qui montre leur meilleure capacité à activer une réponse immunitaire à médiation cellulaire et à produire des anticorps, suite à une infection ou à une vaccination (Beagley and Gockel, 2003).

I. 2. 4) Transmission de l'EBV

L'EBV se transmet principalement par la salive. Chez les enfants la transmission se fait par aérosols de la part des parents, frères et sœurs ou camarades de jeu, alors que chez les adolescents et les jeunes adultes, elle se fait typiquement par les baisers. Il n'y a pas de transmission verticale du virus pendant la grossesse. Bien que l'EBV soit mis en évidence dans le lait maternel, la séroprévalence chez les nourrissons allaités est comparable à celle des enfants nourris au lait en poudre. Les mères semblent développer des anticorps spécifiques qui sont transmis au nourrisson par voie transplacentaire (IgG) ou par le lait maternel (IgA), et joue une fonction protectrice. Une transmission sexuelle est possible, mais elle a épidémiologiquement un rôle de second ordre par rapport à la transmission salivaire. Indépendamment de la symptomatologie clinique, des virus infectieux sont excrétés dans la salive pendant au moins 6 mois après la primo-infection. Il a par ailleurs été montré que 10 à 15% des adultes sains ont une excrétion oropharyngée asymptomatique de l'EBV (Hjalgrim, 2007).

I. 3) Classification, structure et génome de l'EBV

I. 3. 1) Classification du virus

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), premier virus isolé à partir d'une tumeur, est un Herpèsvirus humain (Human herpes virus : HHV).

Les Herpèsvirus appartiennent à une famille regroupant plus de 100 virus connus, qui infectent les animaux ou les êtres humains. Il s'agit de virus ubiquitaires dont la dissémination est fréquemment endémique. Généralement bénignes, les infections par les HHV peuvent entraîner la mort chez certains groupes de patients : âges extrêmes de la vie, grossesse,

patients immunodéprimés (maladies hématologiques, sujets transplantés ou atteints par le SIDA).

Les Herpèsvirus humains comprennent 8 membres, regroupés en 3 sous-familles définies en fonction de leurs propriétés biologiques : les alpha-Herpèsvirus, les bêta-Herpèsvirus et les gamma-Herpèsvirus (**Figure 2**).

Les alpha-Herpèsvirus regroupent les genres *Herpès Simplexvirus* 1 et 2 (HSV-1/HHV-1, HSV-2/HHV-2) et *Varicella Zoster Virus* (VZV/HHV-3, virus de la varicelle et du zona). Les sites d'infection latente sont les ganglions neuro-sensitifs.

Les bêta-Herpèsvirus regroupent les genres *Cytomegalovirus* (HCMV/HHV-5) et *Roseolovirus* (HHV-6, HHV-7). Leurs sites d'infection sont les glandes sécrétoires, le système lymphoréticulaire et les cellules épithéliales de différents tissus.

Les gamma-Herpèsvirus comprennent les genres *Lymphocryptovirus* (HHV-4/EBV) et *Rhadinovirus* (KSHV/HHV-8). Ils se répliquent *in vitro* au sein des cellules lymphoblastoïdes. *In vivo*, ils infectent les lymphocytes B ou T chez qui ils induisent des infections latentes ou lytiques. L'EBV infecte également les cellules épithéliales ou fibroblastiques (Baron, 1996).

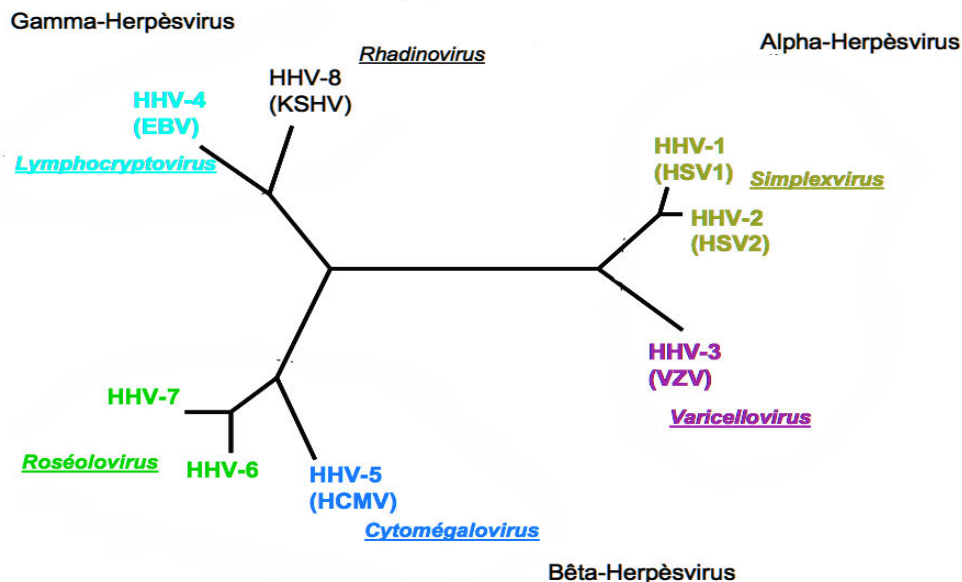


Figure 2 : Arbre de classification des huit différents Herpèsvirus humains. HHV : Human herpes virus, HSV : Human simplex virus, VZV : Varicella Zoster Virus, HCMV : Human cytomegalovirus, EBV : Epstein-Barr virus, KSHV : *Kaposi's* sarcoma-associated herpesvirus (d'après Moore et al., 1996).

I. 3. 2) Structure du virion

Les HHV possèdent une morphologie commune identique. Ils sont tous constitués de 3 structures l'enveloppant.

La première est la capside du virus qui comprend 162 capsomères et mesure environ 100 nm de diamètre. Elle comprend un long brin d'ADN bicaténaire de 120 à 230 000 paires de bases codant un nombre variable de protéines (de 100 à plus de 200 protéines). Cet ADN viral est enroulé sur lui-même (structure torique) protégé et accroché aux protéines de la capsides par un manchon de nucléoprotéines de structure fibrillaire.

La seconde est une couche fibreuse de phospho-protéines, il s'agit du tégment qui entoure la capside.

La troisième est l'enveloppe externe du virus. Elle dérive des membranes cellulaires (nucléaire et cytoplasmique) et est constituée d'un double feuillet lipidique contenant de très nombreux spicules de glycoprotéines virales (mesurant environ 8 nm). Ces glycoprotéines conditionnent l'infectiosité des HHV dans les premières étapes de l'infection (adsorption/fusion/pénétration) et sont très variées (11 glycoprotéines de surface sont par exemple identifiées pour HHV-1 et HHV-2). Cette enveloppe externe est, comme pour la majorité des autres virus enveloppés, l'élément de fragilité du virus. Elle est sensible aux détergents, aux solvants et à la chaleur ; toute altération de l'enveloppe atténue son infectiosité (Baron, 1996).

En ce qui concerne plus précisément le HHV-4/EBV, les virions sont de forme plus ou moins sphérique et mesurent environ 150 nm de diamètre (**Figure 3**). Ce virus est composé d'une molécule d'ADN double brin, linéaire, d'environ 172 kb formant le « core » ou nucléoïde. La nucléocapside icosaédrique mesure 100 à 110 nm de diamètre et comprend 162 capsomères (protéines virales majeures de 160, 47, et 28 kDa). La capside est recouverte du tégment, contenant une protéine majoritaire de 152 kDa. L'enveloppe est composée de plusieurs glycoprotéines (gp) de surface dont les gp220/350, la gp25 (gL, glycoprotein light), la gp85 (gH, glycoprotein heavy), la gp38 et la gp42, qui contribuent à l'infection (Fingerroth et al., 1984) (Tanner et al., 1988) (Speck et al., 2000) (Molesworth et al., 2000) (Mullen et al., 2002) (Johannsen et al., 2004) (Szakonyi et al., 2006).

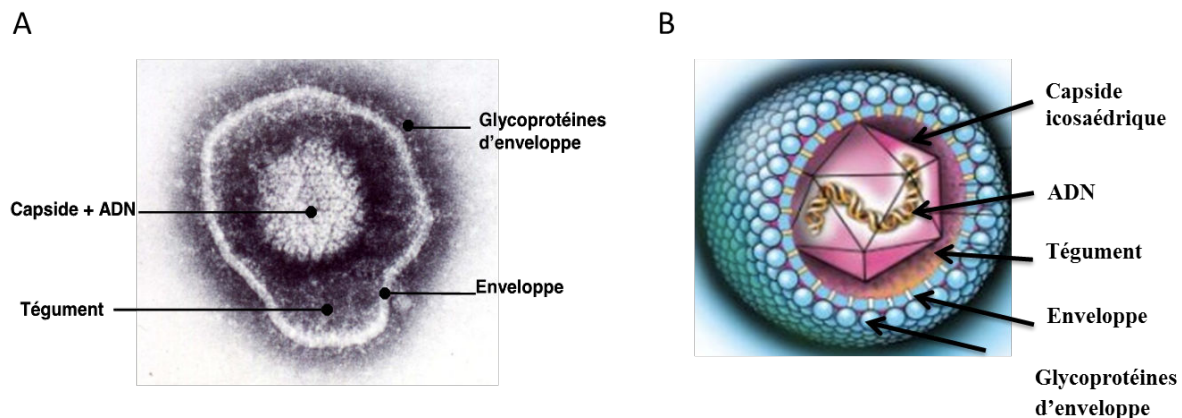


Figure 3 : Structure du virion de l'EBV. (A) Observation en microscopie électronique Coloration négative (d'après une microphotographie du Centre International de Recherche sur le Cancer, J.M. Seigneurin) et (B) représentation schématique (modifié d'après <https://www.helmholtz-muenchen.de/en/agv/research/research-groups/prevention-and-immunomodulation/projects/index.html>).

I. 3. 3) Génome de l'EBV

L'EBV est le premier Herpèsvirus dont le génome a été complètement séquencé en 1984, à partir de la souche de référence B95-8 (lymphocytes B de marmousets infectés par l'EBV provenant de patients atteints de MI) (Baer et al., 1984). Ce séquençage a permis d'identifier une centaine de cadres de lecture ouverts (*open reading frame* : *ORF*), répertoriés d'après les fragments de restriction obtenus avec l'enzyme *Bam*H1. Les gènes de l'EBV sont nommés selon le fragment de restriction *Bam*H1 dans lequel ils se trouvent, l'orientation de leur transcription (vers la gauche : *leftward* ou vers la droite : *rightward*) et selon le cadre de lecture (*frame*). Par exemple, *Bam*H1 N *leftward frame* 1 s'écrit BNLF1 (Young and Murray, 2003).

Le génome de l'EBV est un ADN double brin d'environ 172 kb, constitué de deux domaines uniques séparés par des séquences répétées en tandem de 3071 pb (IR1 : Internal Repeat 1 ou région répétée interne 1) : le domaine U_S (short unique region) de 15 kpb et le domaine U_L long de 150 kpb (long unique region) (**Figure 4A**). Le domaine U_S est constitué du domaine unique U1. Le domaine U_L est composé de trois séquences répétées internes, IR2, IR3 et IR4, le divisant en quatre domaines uniques : U2, U3, U4 et U5 (Hudson et al., 1985) (Murray and Young, 2001).

L'origine de réplication latente Ori-P est située dans le domaine U1. A proximité des régions

IR2 et IR4, existent deux régions homologues de 1 kpb nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences contiennent les deux origines de réplication lytique (oriLyt) de l'EBV (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

Le génome viral est sous forme linéaire au sein de la particule virale. Il est flanqué à ses deux extrémités de deux séquences TR répétées (Terminal Repeat) de 4 à 12 répétitions en tandem d'une séquence de 550 pb, suivant les souches. Il peut se circulariser lors de l'infection de la cellule hôte grâce à la fusion de ces deux TR, formant alors le CCC (Covalently Closed Circle) ou épisode dans le noyau cellulaire (**Figure 4B**). Le virus peut persister dans la cellule de manière latente sous cette forme épisomale. L'EBV se réplique de façon synchrone avec la cellule infectée lors de la phase S du cycle cellulaire, en utilisant l'origine de réplication latente : OriP (Adams and Lindahl, 1975) (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

On distingue d'une part les gènes codant pour les protéines de latence exprimées lors de l'infection dite latente, qui permettent la persistance du virus dans la cellule en absence de synthèse de nouvelles particules virales et d'autre part les gènes codant pour les protéines du cycle lytique, qui sont principalement des protéines de structure et des enzymes de transcription et de réplication virale (Tselis, 2013).

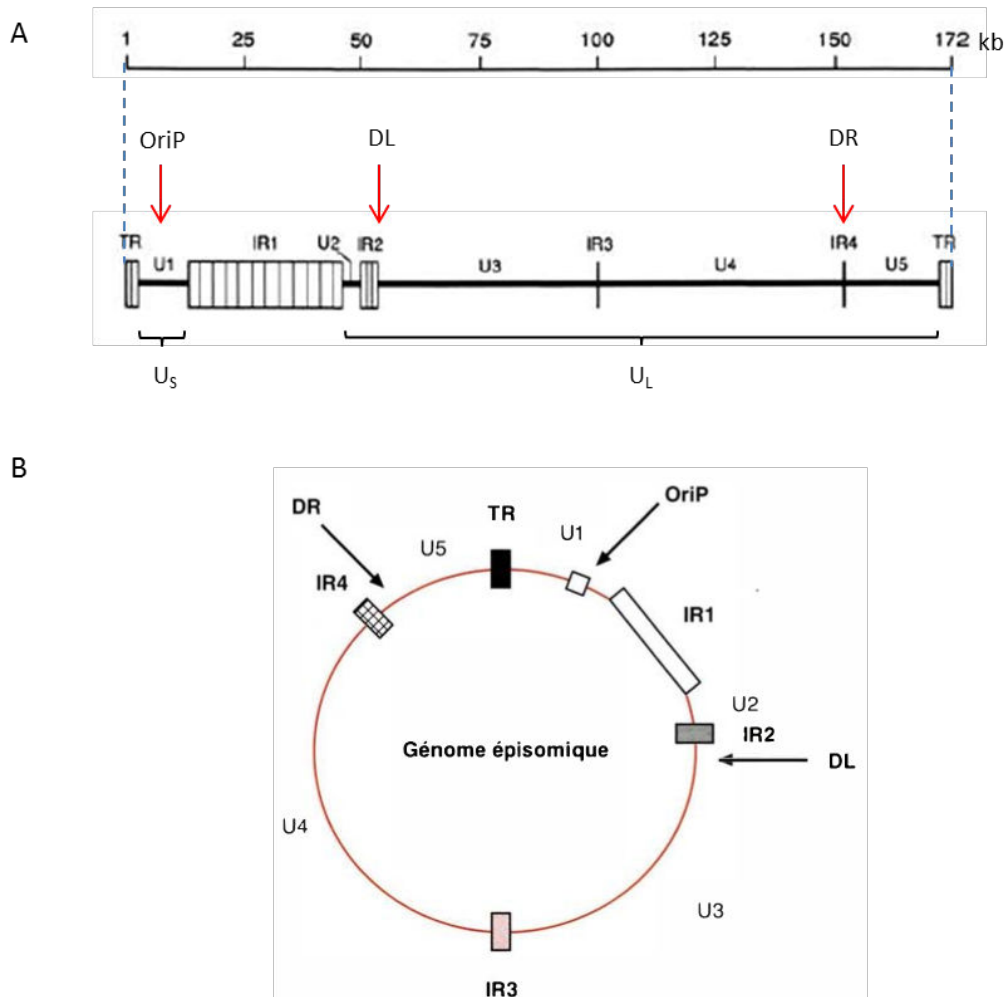


Figure 4 : Organisation du génome de l'EBV sous sa forme linéaire (A) et épisomique (B) de 172 kb. TR : séquences terminales répétées (Terminal Repeat) ; U1 à U5 : séquences uniques ; IR1 à IR4 : séquences internes répétées ; OriP : Origine de répllication latente ; DL et DR : séquences homologues contenant les origines de répllication lytique Orilyt (modifié d'après Kieff, 1990 et Straus et al., 1993).

II. Infection et persistance virale

II. 1) Infection et cellules cibles

Les cellules B et les cellules épithéliales infectées par l'EBV (à l'exception des cellules B mémoires qui n'expriment aucune protéine de latence virale), sont la cible d'une très forte réponse immunitaire impliquant surtout les cellules NK et T, qui peuvent alors à leur tour être infectées par l'EBV (Callan et al., 1998).

II. 1. 1) Cellules épithéliales

Deux carcinomes humains, les carcinomes nasopharyngés endémiques et une petite fraction des carcinomes gastriques, sont caractérisés par des cellules tumorales infectées par l'EBV d'une manière latente. L'EBV a également été trouvé occasionnellement dans les cellules épithéliales normales non transformées de l'oropharynx (Walling et al., 2001), indiquant que ce virus infecte les cellules épithéliales *in vivo*. Il infecte les cellules épithéliales humaines primaires et exprime certains gènes viraux lytiques ainsi que des gènes viraux latents (Shannon-Lowe et al., 2006). Malheureusement, l'infection *ex vivo* par l'EBV des cellules épithéliales humaines primaires est très inefficace : les cellules ne synthétisent pas de nouveaux virions et le virus n'est pas maintenu à long terme dans la culture cellulaire. Il est probable que les cellules épithéliales infectées sont incapables de réaliser la synthèse de nouveaux virions (Walling et al., 2001).

Les mécanismes d'entrée et de sortie de l'EBV des cellules épithéliales du nasopharynx ne sont pas encore très clairs. Tugizov et al. (2003) ont pu montrer que l'EBV peut infecter les cellules épithéliales aussi bien par leur pôle apical que par leur pôle basolatéral, et que ce virus peut se propager d'une cellule épithéliale à une autre par leurs pôles latéraux (**Figure 5**). La pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales se fait grâce à la liaison de la glycoprotéine virale de surface BMRF2 à une intégrine cellulaire $\beta 1$ et non par la glycoprotéine virale gp350/220 impliquée dans l'entrée du virus dans les lymphocytes B. Toutefois, le blocage de la liaison BMRF2-intégrine n'empêche que partiellement l'infection, suggérant que d'autres molécules contribuent à l'entrée du virus (Tugizov et al., 2003).

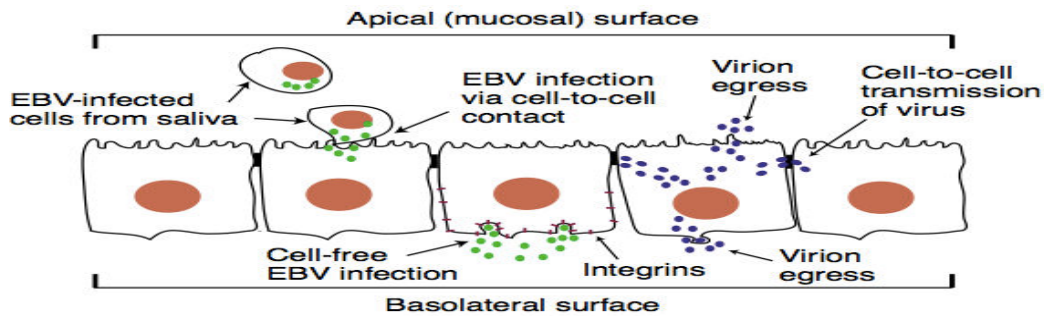


Figure 5 : Pénétration de l'EBV dans les cellules Détroit-562^{sort} épithéliales polarisées et propagation intercellulaire. L'infection des cellules épithéliales de l'oropharynx par l'EBV peut se faire selon 2 voies différentes : par contact cellulaire directe de la surface apicale de l'épithélium de l'oropharynx avec les cellules salivaires EBV positive ou par entrée des virions libres par la surface basolatérale de l'épithélium. L'infection par la surface basolatérale peut être médiée par l'interaction des virions avec les intégrines de surface cellulaire. Les virions peuvent sortir par les membranes apicales ou basolatérales, ce qui permet leur sécrétion dans la salive et le tissu submuqueux, respectivement. Les virions peuvent se propager aux cellules voisines non infectées par les membranes latérales et disséminer l'infection par l'épithélium muqueux (d'après Tugizov et al., 2003).

II. 1. 2) Lymphocytes B

L'infection des lymphocytes B par l'EBV débute par l'attachement de la glycoprotéine transmembranaire majeure gp350/220 de l'enveloppe virale à la molécule de surface des cellules B, CD21 ou récepteur 2 du complément (CR2) (Weis et al., 1984) (Fingerroth et al., 1984) (Frade et al., 1985). La glycoprotéine d'enveloppe virale gp42 (Molesworth et al., 2000) (Oda et al., 2000) se lie aux molécules HLA de classe II présentes à la surface des cellules et constituent le corécepteur de l'EBV (Li et al., 1997). Il y a formation d'un complexe entre gp42 et les glycoprotéines virales gp85 et gp25, initiant avec le CMH de classe II la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée du virus dans la cellule par endocytose (Fingerroth et al., 1984) (Tanner et al., 1988) (Molesworth et al., 2000) (Speck et al., 2000) (Borza and Hutt-Fletcher, 2002) (Mullen et al., 2002) (Johannsen et al., 2004) (Szakonyi et al., 2006) (**Figure 6**). La pénétration du génome viral dans des cellules par phagocytose de corps apoptotiques EBV positifs est décrite comme un autre mécanisme d'infection de type indirecte (Holmgren et al., 1999).

Les interactions entre l'EBV et le lymphocyte B sont bien caractérisées *in vitro*. On peut discriminer deux types de lignées cellulaires infectées par le virus : les lignées cellulaires lymphoblastoïdes ou LCLs (Lymphoblastoid Cell Lines) issues de lymphocytes B primaires circulants immortalisées par l'EBV ou des lignées, telles que celles de BL, déjà immortalisées

par un proto-oncogène (c-myc dans le cas des BL) et infectées par l'EBV.

Les LCLs sont très peu permissives à la réplication virale, elle ne se multiplient pas en gélose semi-molle et n'induisent pas de tumeurs chez les souris nude. En culture, elles ont un aspect polymorphe avec une différenciation plasmocytoïde et expriment des marqueurs d'activations tels que CD23, CD30, CD39 et Ki24, des molécules d'adhérence leucocytaire non spécifiques CD11a/CD18 (LFA1), CD54 (ICAM1) et CD58 (LFA3), et l'ensemble des neuf protéines virales de latence : 6 antigènes nucléaires (Epstein Barr Nuclear Antigen : EBNA) et 3 protéines membranaires (Latent Membran Protein : LMPs). Ce phénotype a été défini par l'équipe de Rickinson comme étant la latence de type III (Rowe et al., 1992). Les protéines de latence virale et les types de latence (définis en fonction des gènes de latence exprimés) seront décrits en détail ultérieurement.

Les cellules de lignées de lymphomes de Burkitt infectées par l'EBV se multiplient en gélose semi-molle, induisent des tumeurs chez la souris nude et ont un aspect monomorphe en culture. Leur phénotype correspond à celui des lymphomes de Burkitt, exprimant CD10 et CD77. Elles n'expriment pas les marqueurs d'activation et présentent une faible expression des molécules d'adhérence CD11a/CD18 et CD54, avec absence de CD58 (Billaud et al., 1987). *In vivo*, comme dans les biopsies de lymphomes de Burkitt, l'expression des EBNA est restreinte à EBNA1, ce qui correspond à la latence de type I d'après la caractérisation de l'équipe de Rickinson (Rowe et al., 1992).

Selon une littérature plus récente, durant ces deux types de latence, deux petits ARN non polyadénylés sont codés par l'EBV (EBER1 et EBER2). Ils contribuent à la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la production de cytokines modulant la réponse immune innée (Kang and Kieff, 2015). Par ailleurs, la transcription de la région BamH1 A conduit à l'expression d'un ensemble de transcrits alternativement épissés et fortement exprimés appelés BARTs (BamH1 A rightward transcripts). Les introns de ces transcrits, avec ceux de la région BHRF1 (BamH1 fragment H rightward open reading frame 1), contiennent les précurseurs d'une vingtaine de microRNA (miRNA) pouvant produire une quarantaine de miRNA matures. Ces derniers jouent un rôle dans le maintien de l'infection latente, interfèrent avec les processus d'apoptose (activateurs ou inhibiteurs) ou bloquent la réponse aux interférons (Kang and Kieff, 2015) (Marquitz et al., 2015) (Forte and Luftig, 2011). Les EBERs et les miRNA ainsi que leurs rôles seront décrits en détail ultérieurement.

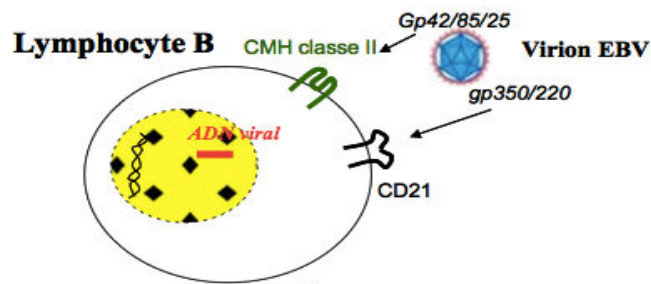


Figure 6 : Attachement de l'EBV aux lymphocytes B. L'EBV interagit avec le CD21 des lymphocytes B *via* le complexe gp350/220 viral. La fusion de la membrane plasmique et de la nucléocapside a lieu grâce à l'interaction du complexe glycoprotéique viral gp42/85/25 avec les molécules du CMH II de la cellule. L'ADN viral linéaire s'intègre alors dans le noyau et persiste généralement sous forme d'épisome latent (modifiée d'après Middeldorp et al., 2003).

II. 1. 3) Lymphocytes T et NK

L'infection *in vivo* des cellules T et NK (primo-infection ou persistance) semble être un événement relativement rare.

Des études sur coupes de tissus d'amygdales excisées au cours de la phase aiguë de la MI lors de la primo-infection par l'EBV et sur coupes des ganglions lymphatiques permettent de mettre en évidence des cellules T (le plus souvent CD4⁺) infectées par l'EBV. Le nombre de cellules T infectées est cependant plus faible que celui de cellules B (Deamant et al., 1993) (Anagnostopoulos et al., 1995) (Niedobitek et al., 1997) (Verbeke et al., 2000) (Trempat et al., 2002) (Hudnall et al., 2005). Le programme d'expression des gènes viraux de latence a montré qu'il s'agit généralement d'une latence de type II (Groux et al., 1997).

Les lymphocytes T matures du sang périphérique semblent exprimer faiblement le CD21 (Fischer et al., 1991) (Shannon-Lowe et al., 2005) mais il est possible d'en infecter une faible proportion *in vitro* (Guan et al., 1996). L'infection de thymocytes primaires a pu être réalisée, révélant l'expression d'un antigène nucléaire viral (EBNA1) après 12 jours (Watry et al., 1991). Le niveau d'expression de CD21 varie avec la maturité cellulaire et au cours du développement des cellules T dans le thymus, cependant une expression transitoire serait suffisante pour permettre la liaison à l'EBV et l'entrée virale.

Un mécanisme d'infection indépendant de CD21 ou *via* une molécule présentant une homologue a également été évoquée (Tsoukas and Lambris, 1988). Les cellules T de la lignée

MOLT 4 (Uren et al., 1977), établie à partir du sang périphérique d'un patient présentant une leucémie lymphoblastique aiguë (Minowada et al., 1972), expriment la molécule CD21 et peuvent lier l'EBV, mais le CD21 ne semble pas contribuer à l'entrée du virus dans la cellule (Shannon-Lowe et al., 2005). De même, l'EBV peut infecter de nombreuses cellules T de type leucémiques lymphoblastiques pour lesquelles l'expression de CD21 est très variable (négatif pour les cellules HSB-2, Hut-78, CEM et T-ALL-1, faible pour les cellules Jurkat ou élevé pour les cellules HPB-ALL (Fingerhuth et al., 1988).

Les cellules NK expriment les molécules HLA de classe II à leur surface mais pas la molécule CD21. Le processus de liaison de l'EBV et son entrée dans ces cellules sont mal connus. L'infection *in vivo* a lieu *via* une synapse immunologique. La formation de synapses entre les cellules NK et des cellules B autologues EBER positives (ARN viral de latence) peut intervenir lors de l'infection primaire au niveau des amygdales et des ganglions lymphatiques, chez le sujet sain infecté de manière latente (Tremplat et al., 2002) (Hudnall et al., 2005). L'infection *in vitro* de deux lignées cellulaires NK leucémiques et de cellules primaires humaines a été publié en 2004. Les stades précoces de l'infection montrent la coexistence d'une infection lytique et d'une infection latente. La majorité des cellules infectées entrent en apoptose après 72h. Deux clones isolés ont montré l'existence de latences de type I et de II. Une étude ultérieure réalisée par le même groupe a permis de créer des sous-clones de latence II (Isobe et al., 2004) (Isobe et al., 2008).

II. 2) Persistance virale

Suite à la primo-infection, l'EBV persiste durant toute la vie de l'individu dans l'organisme sans aucune conséquence pathologique apparente. La persistance du virus chez l'individu est le résultat d'un équilibre complexe entre 3 processus :

- L'existence de deux formes complémentaires d'infection virale: latente et productive. La **forme latente** est caractérisée par l'expression de protéines dites protéines de latence virales ainsi que d'ARN non codant (EBER et miRNA), sans production de nouveaux virions par la cellule infectée. Le nombre des protéines de latence exprimées varie selon la cellule infectée et permet de définir plusieurs types de latences (0, I, II et III) ; **L'infection productive** se caractérise par l'expression séquentielle de nombreuses protéines dénommées protéines du cycle lytique et aboutit, lorsque l'expression est complète, au relargage par la cellule de nouvelles particules virales

infectieuses et à la lyse de la cellule. Ces deux types d'infection sont possibles dans les lymphocytes B et probablement dans certaines cellules épithéliales.

- Les mécanismes de différenciation et d'activation physiologiques des lymphocytes B du tissu lymphoïde, en particulier au niveau du nasopharynx, ce qui conditionne les différentes formes d'infection virales décrites précédemment.
- Une réponse immunitaire anti-EBV qui, sans pouvoir éradiquer l'infection, contrôle la quantité de virions libres et le nombre de cellules infectées dans l'organisme, dans un équilibre hôte/virus placé essentiellement sous le contrôle des lymphocytes T cytotoxiques.

II. 2. 1) Cycle de l'EBV

L'infection par le virus étant restreinte à l'homme et la primo-infection étant majoritairement asymptomatique, les connaissances du cycle de l'EBV sont généralement obtenues à partir d'études réalisées sur des patients présentant une MI (Moghaddam et al., 1997).

Chez les individus sains, les principales cellules cibles sont les lymphocytes B et les cellules épithéliales.

L'infection primaire par l'EBV débute au niveau de la cavité buccale. Le virus pénètre par voie oropharyngée et utilise des glycoprotéines cellulaires spécifiques pour infecter les cellules épithéliales et les lymphocytes B naïfs. Le mode de vie de l'EBV semble consister en trois phases illustrées dans la **Figure 7**. Lors de l'infection, le virus se fixe à ses récepteurs à la surface cellulaire, s'intériorise et délivre son génome d'ADN linéaire épigénétiquement naïf au noyau de la cellule. La circularisation de l'ADN viral est l'un des tout premiers événements afin de protéger les terminaisons d'ADN de la dégradation et de minimiser l'induction de la réponse aux dommages de l'ADN de la cellule infectée (Hurley and Thorley-Lawson, 1988). Quelques heures après l'infection, un certain nombre de gènes lytiques viraux se trouve exprimé conjointement avec des gènes latents : c'est la phase de prélatence virale. Une dizaine de jours plus tard, l'expression du gène latent de l'EBV prédomine et l'expression des gènes lytiques devient presque indétectable. La phase de latence est établie. Lors de stimuli appropriés, à savoir l'activation des immunoglobulines de surface sur les cellules B mémoires, une cascade de signalisation induit l'expression du facteur de transcription viral BZLF1 (prologue de la réactivation lytique) conduisant alors à l'activation du cycle lytique et la synthèse de nouveaux virions (**Figures 7 et 8**).

En effet, lors de la phase de prélatence, les transcrits viraux sont détectables avant la transcription de l'ADN viral dans les cellules nouvellement infectées. Les cellules qui réalisent la synthèse des herpesvirus libèrent des exosomes, des particules semblables à des virus, et des virions qui contiennent les transcrits viraux (Kalamvoki et al., 2014) (Jochum et al., 2012a) (Bresnahan and Shenk, 2000) (Bechtel et al., 2005) (Cliffe et al., 2009) (Greijer et al., 2000) (Sciortino et al., 2001). La délivrance de transcrits viraux aux cellules infectées permet l'expression immédiate des facteurs viraux provoquant des mécanismes d'échappement au système immunitaire et modulant l'expression des gènes cellulaires (Kalamvoki et al., 2014). En conséquence, ceci active les lymphocytes B au repos et soutient leur infection latente (Jochum et al., 2012a) (Jochum et al., 2012b). La transcription de l'ADN viral commence probablement peu de temps après l'infection des lymphocytes B. Aucune étude systématique ne fournit une analyse complète des gènes viraux nouvellement transcrits dans ces cellules. Dès six heures après l'infection, les transcriptions à partir du promoteur W (Wp) codent pour les protéines latentes EBNA-LP et EBNA2, qui sont les premières protéines latentes de l'EBV détectables dans les lymphocytes B nouvellement infectés (Schlager et al., 1996) (Woisetschlaeger et al., 1990) (Alfieri et al., 1991). D'une manière surprenante des gènes viraux lytiques (comme les gènes anti-apoptotiques des membres de la famille Bcl-2 codés par l'EBV (Altmann and Hammerschmidt, 2005), le gène BZLF1 responsable du switch latence / réactivation (Wen et al., 2007) (Kalla et al., 2010), les gènes BMRF1 et BRLF1 à fonction transactivatrices et régulatrices (Jochum et al., 2012a) (Jochum et al., 2012b) (Kalla et al., 2010)) sont également transcrits dans les lymphocytes B nouvellement infectés. Certains gènes viraux essentiels pour l'amplification lytique de l'ADN viral et les gènes codant pour des protéines virales structurales ne sont pas exprimés dans la phase de pré-latence (Kalla et al., 2010).

L'EBV entre ensuite en phase de **latence III** ou phase de **prolifération cellulaire** (growth program) et exprime alors tous les antigènes du cycle de latence. Une partie des lymphocytes B se différencie ensuite en cellules B mémoires avec hypermutation somatique des gènes d'immunoglobulines (Ig). Ils constituent un centre germinatif et le virus entre en **latence II** avec perte de l'expression de certains gènes de latence. Une réponse des cellules T naïves présentatrices de l'antigène se met en place en parallèle afin de contrôler ces événements (excepté chez le patient immunodéprimé). Certains lymphocytes B échappent au système immunitaire et deviennent des cellules B mémoires CD27⁺ quiescentes et à longue durée de vie, au sein desquelles le virus entre en **latence 0** avec une quasi suppression de l'expression

des antigènes viraux. L'EBV sous forme épisomale se réplique alors avec le lymphocyte B lorsqu'il se divise et entre en **latence I** (Young and Rickinson, 2004). Il est également possible que ce virus infecte directement les lymphocytes B mémoires puisque au moment de la primo-infection des cellules infectées sont retrouvées au niveau des zones extrafolliculaires et non au sein des centres germinatifs, avec absence d'hypermutation des gènes d'Ig (Cohen, 2000). Cette notion de cellules «réservoirs » contribue à la persistance de l'EBV chez l'homme (Heslop, 2009).

Au cours du temps, le réservoir de cellules B mémoires infectées par l'EBV peut être soumis à des contrôles physiologiques régissant la migration et la différenciation de ces dernières. Ces cellules peuvent être recrutées au centre germinatif. Les différents programmes de latence sont alors activés et les cellules peuvent soit entrer dans le réservoir de cellules B mémoires, soit subir une différenciation plasmocytaire leur permettant probablement de se déplacer vers les muqueuses de l'oropharynx avec activation de cycle lytique du virus. Les étapes de la réplication lytique seront décrites en détail ultérieurement.

L'existence de nombreuses pathologies liées à l'EBV, et ce pour différents organes, implique une dissémination du virus dans l'organisme possible grâce aux lymphocytes B périphériques. Il a été montré que 1 à 60 lymphocytes circulants par million restent infectés par l'EBV chez les porteurs sains, et que ces lymphocytes correspondent à des cellules B mémoires quiescentes (Miyashita et al., 1997). Des lymphocytes B infectés ont de plus été mis en évidence dans des tissus lymphoïdes chez des donneurs sains ou des patients atteints de MI (Steven, 1997). La persistance des cellules B infectées est possible grâce à l'expression d'un nombre restreint de gènes viraux, ce qui empêche l'intervention du système immunitaire de l'hôte. Les molécules B7, co-stimulatrice des cellules T mémoires, ne sont pas détectées à la surface de ces lymphocytes (Miyashita et al., 1997).

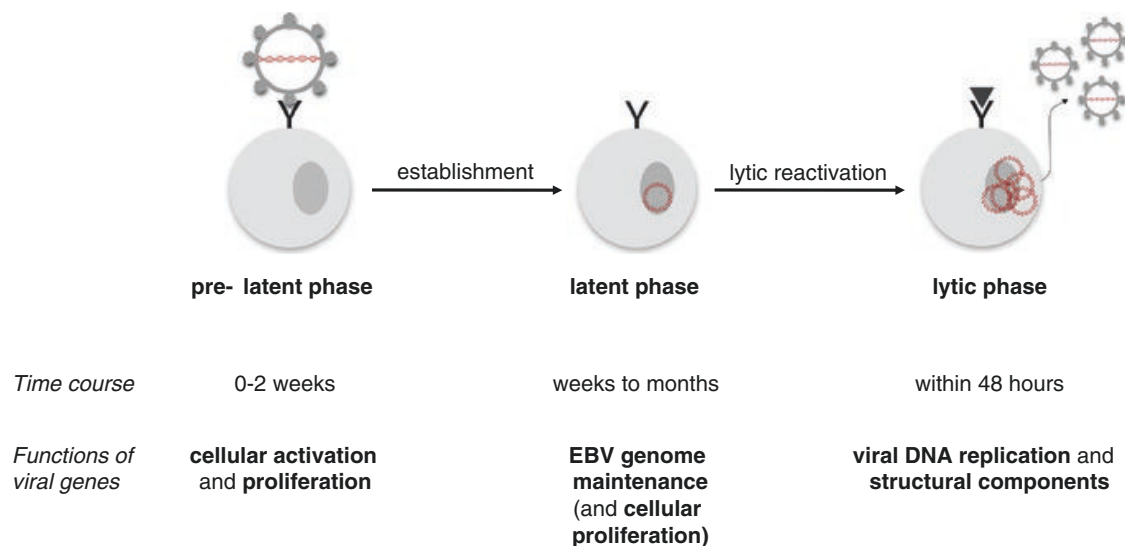


Figure 7 : Les trois différentes phases du mode de vie de l'EBV. Le schéma montre un seul virion de l'EBV infectant un lymphocyte B. Le virus délivre son ADN double brin linéaire dans le noyau de la cellule dans laquelle l'ADN de l'EBV est présent en plusieurs exemplaires (non représenté) d'un minichromosome EBV (cercle rouge). Au cours de la latence, cet état est maintenu même dans des cellules proliférantes. Au contact de l'antigène par l'immunoglobuline de surface, le gène BZLF1 responsable de la commutation moléculaire chez l'EBV est activé et induit la phase lytique productive. La cellule produit alors de nouveaux virions. Le moment et la durée de l'infection au cours des trois différentes phases de l'infection par l'EBV sont présentés en même temps que les fonctions des gènes viraux exprimés dans les différentes phases. Dans les cellules B infectées de façon latente *in vitro*, le virus induit leur prolifération continue qui dépend de l'expression de certains gènes viraux latents. Contrairement aux anciens modèles montrant l'expression des gènes lytiques viraux dans les cellules épithéliales et la formations de nouveaux virions immédiatement après la primo-infection, ce modèle est principalement basé sur des expériences avec des lymphocytes B humains primaires et des cellules HEK293 (une lignée cellulaire établie avec des caractéristiques épithéliales). Le modèle proposé est cependant discutable (d'après Hammerschmidt, 2015).

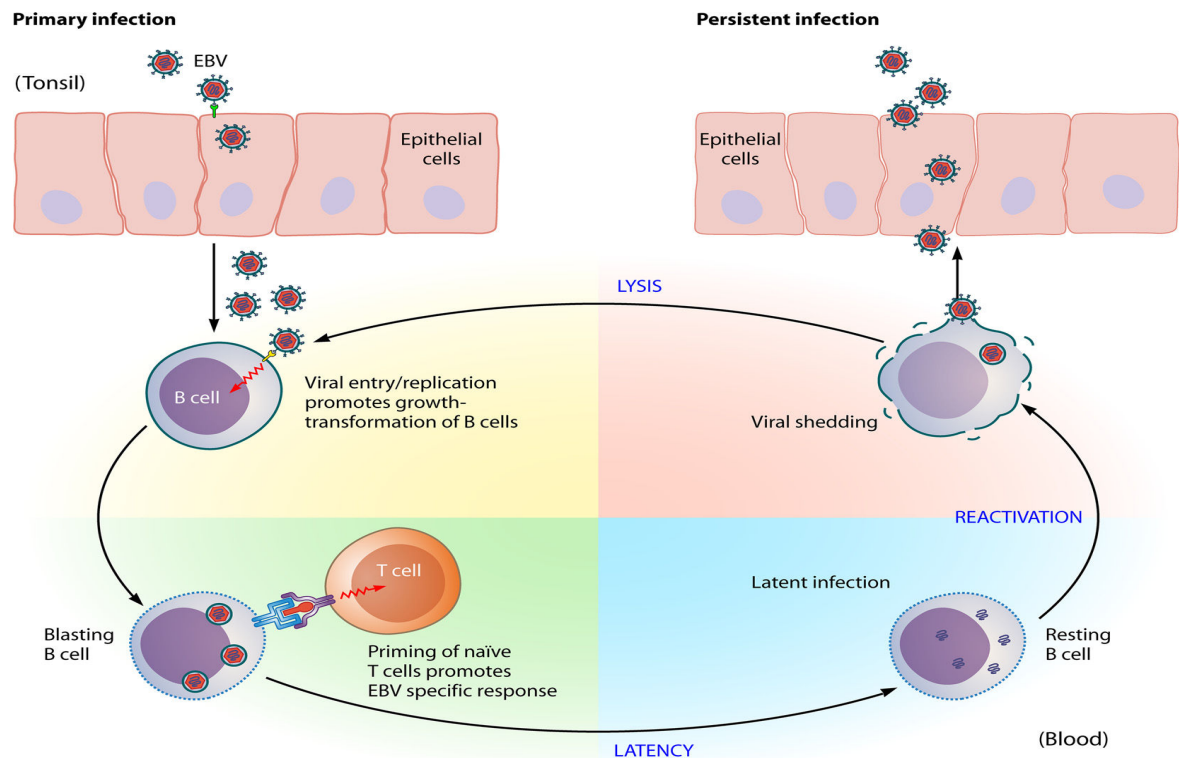


Figure 8 : Cycle de l'EBV chez des porteurs sains. L'infection primaire par l'EBV débute dans la cavité buccale. Le virus infecte les cellules épithéliales et les cellules B naïves. Le génome de l'EBV pénètre dans le noyau des cellules B, où il se réplique, ce qui active le programme de croissance des cellules B et leur prolifération. En parallèle, des cellules T naïves évoluent en cellules présentatrices de l'antigène permettant normalement l'élimination des cellules B infectées. Ensuite, soit le virus persiste en cycle lytique dans les cellules B mémoires activés circulantes, soit la plupart des protéines virales ne sont plus exprimées ce qui conduit à la latence. L'EBV en cycle lytique ou réactivé à partir de la latence peut ensuite être excrété sous forme de virions (d'après Odumade et al., 2011).

III. Latence virale

Les lymphocytes B sont les cellules clefs de l'établissement de la latence virale de l'EBV. Les patients ayant une hypogammaglobulinémie liée à l'X et qui manquent de lymphocytes B ne présentent pas d'infection persistante à l'EBV (Faulkner et al., 1999). Cette **infection latente** permet le maintien du génome viral sous forme d'épisome à l'intérieur des noyaux cellulaires des cellules infectées, favorisant ainsi leur prolifération et la persistance de l'EBV sans production virale active. Elle permet également, suite à l'expression des protéines virales du programme de croissance (ou programme de latence III), l'activation et la prolifération des lymphocytes B infectés, d'une manière similaire à celle que peut induire une stimulation antigénique (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

III. 1) Les différents types de latence

Contrairement à la réplication lytique, la réplication épisomique au cours de la phase de latence se produit par l'intermédiaire de l'ADN polymérase de l'hôte. Selon le type cellulaire infecté et les conditions physiologiques, cinq types de latences ont été décrits (0, I, II, III et latence atypique) (**Figure 9**). Ces types de latence sont fonction de la transcription ou non de certains gènes viraux appelés gènes de latence et codant pour : les **ARN EBERs** (Epstein-Barr Encoded small RNAs), des **miRNA** exprimés à partir de deux régions BamH1-A et BHRF1 du génome de l'EBV (miBART et miBHRF1 respectivement), les protéines nucléaires **EBNA** (Epstein-Barr Nuclear Antigen, EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) et les protéines membranaires **LMP** (Latent Membrane Protein, LMP1, 2A, 2B). Le profil de latence est associé à une utilisation différentielle des promoteurs viraux Qp (expression d'EBNA1), Cp et Wp (expression de EBNA2, 3A, 3B, 3C et LP) et des promoteurs des LMPs (expression de LMP1, 2A et 2B). Ces promoteurs spécifiques des LMPs codent pour des protéines membranaires et sont à activité stimulée par EBNA-2 (Laux et al., 1994). La transcription de LMP-2A et 2B nécessite la circularisation du génome et les protéines LMP- 2B et LMP-1 sont transcrites à partir du même promoteur bidirectionnel.

La **latence 0** est quasi silencieuse ; elle est retrouvée chez les lymphocytes B mémoires circulants, et est caractérisée par une expression transcriptionnelle de LMP2A, et des ARNs EBERs (Küppers, 2003). L'expression de la protéine nucléaire EBNA1 est controversée.

La **latence I** est retrouvée dans les lymphomes de Burkitt où il y a expression des EBERs, des BARTs et d'EBNA1, via le promoteur Qp. Les promoteurs Cp et Wp sont réprimés et les autres protéines ne sont pas exprimées. Les cellules de lymphome de Burkitt sont instables en latence I *in vitro*, elles changent alors le profil d'expression de gènes de latence et de phénotype, aboutissant à une latence de type III.

La **latence II** est retrouvée dans le carcinome du nasopharynx, le lymphome de Hodgkin et dans certains lymphomes T et NK. Elle se caractérise par l'expression des EBERs et des BARTs, une répression des promoteurs Cp et Wp (absence d'expression de EBNA2, 3A, 3B, 3C et LP) et une activation du promoteur Qp et des promoteurs des LMP (expression de LMP1, 2A et 2B).

La **latence III** est caractéristique des lymphocytes B infectés et immortalisés *in vitro* (Lymphoblastoid cell lines ou LCLs), ainsi que lors des lymphoproliférations chez les sujets immunodéprimés. Il y a expression des EBERs, des BARTs et de l'ensemble des protéines de latence (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP et LMP1, 2A, 2B) (Grywalska and Rolinski, 2015).

La **latence atypique**, décrite notamment dans des cas de lymphomes de Burkitt endémiques associés à l'EBV, est caractérisée par l'expression des protéines EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C et une forme tronquée d'EBNA-LP, sans expression des protéines LMPs. La protéine EBNA-2 n'est pas exprimée suite à la délétion du gène correspondant (Kelly et al., 2002a). Dans ces cas de latences le promoteur Wp des EBNAs est dominant par rapport au promoteur Cp (Hutchings et al., 2006).

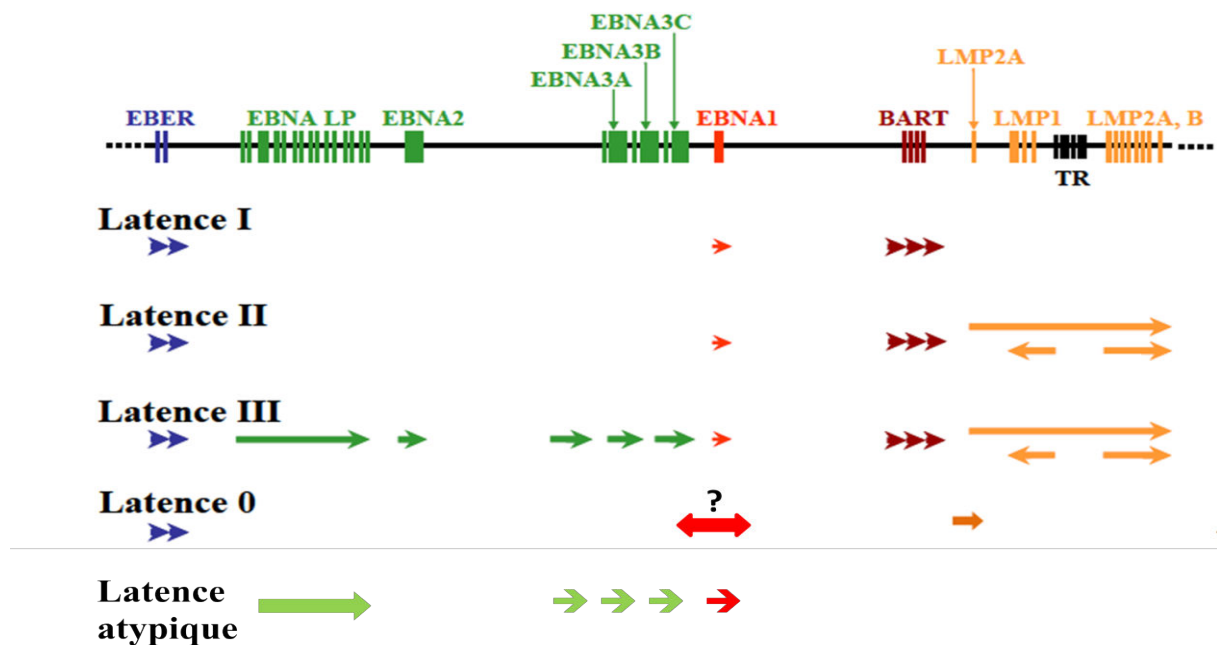


Figure 9 : Schéma représentant le profil de transcription des gènes viraux en fonction des différents types de latence. EBER: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA ; EBNA-LP, -1, -2, -3A, -3B et -3C: Epstein-Barr Nuclear Antigen ; LMP-1, -2A, -2B: Latent Membrane Protein ; BART : BamHI-A righthand transcripts. TR: Terminal Repeat (modifié d'après Young et al., 2000).

III. 2) Les ARN de latence

Les **ARNs viraux de latence** sont les EBERs, les miBART et les miBHRF1 (**miRNA** exprimés à partir de deux régions BamH1-A et BHRF1 du génome de l'EBV) (Moss et al., 2014).

Les **EBERs** comportent les EBER1 (167 nucléotides) et les EBER2 (172 nucléotides). Ce sont de petits ARN non polyadénylés, transcrits par l'ARN polymérase III, ayant une expression plus importante durant la phase de latence que pendant la phase lytique (Rosa et al., 1981) (Greifenegger et al., 1998). Ces EBERs sont les transcrits les plus abondants dans les cellules infectées par l'EBV. Ils sont retrouvés au niveau du noyau où ils s'associent avec des protéines pour former le complexe ribonucléoprotéique, ainsi qu'au niveau du cytoplasme dans la région du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi (Schwemmle et al., 1992). Ils induisent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et de l'interleukine 10 (IL10) qui contribue à la malignité et à la maintenance de la croissance des BL et agissent comme des inhibiteurs de l'activité antivirale des interférons α et γ (IFN α et IFN γ). Les EBERs induisent une résistance aux agents chimiothérapeutiques et favorisent la migration des cellules cancéreuses en induisant la surexpression d'IL6, qui conduit à l'activation de STAT3. Ces EBERs diminuent significativement l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p21 et p27, conduisant les cellules à la prolifération (Banerjee et al., 2013).

Les **miRNAs** transcrits à partir des régions BART et BHRF1 représentent environ 40 ARN simples brins de petite taille (21 à 25 nucléotides). Ils résultent de l'épissage de 25 précurseurs de miRNA (pré-miRNA) majoritairement transcrits à partir de la région BART (22 pré-miBART et 3 pré-miBHRF1) (Moss et al., 2014). Ces mi-RNAs sont exprimés chez de nombreuses cellules tumorales infectées par l'EBV et l'expression de chacun dépend du type cellulaire considéré. De nombreuses cibles cellulaires des miRNA de l'EBV ont été identifiées : Bim (cible de BART9, 11 et 12), BRUCE (BART15-3p), CASP3 (BART1-3p), CLEC2D (BART1-3p), CAPRN2 (BART13-3p), CXCL11 (BHRF1-3), DICER1 (BART6-5p), DAZAP2, DICE1, IPO7, PDE7A et PELI1 (BART-3), LY75 et SP100 (BART1-5p), PDCD1LG2 (BHRF1-2-5p, BART1-5p et BART15-3p), PUMA (BART5), T-bet (BART20-5p), TOM22 (BART16), NLRP3 (BART15), ZNF451 (BHRF1-1) (Kuzembayeva et al., 2014). Les miBART sont exprimés chez pratiquement toutes les cellules en latence de l'EBV tandis que l'expression des miBHRF1 est essentiellement restreinte à la latence III (Kang and Kieff, 2015) (Forte and Luftig, 2011). Les miRNAs peuvent contribuer au maintien de l'infection latente en inhibant l'apoptose, la réponse aux interférons ou l'expression de l'ADN polymérase virale BALF5 nécessaire au cycle lytique ainsi qu'en favorisant la prolifération cellulaire (Forte and Luftig, 2011). Le miBART15-3p a toutefois été décrits comme favorisant l'apoptose (Nikitin et al., 2010) (**Figure 10**).

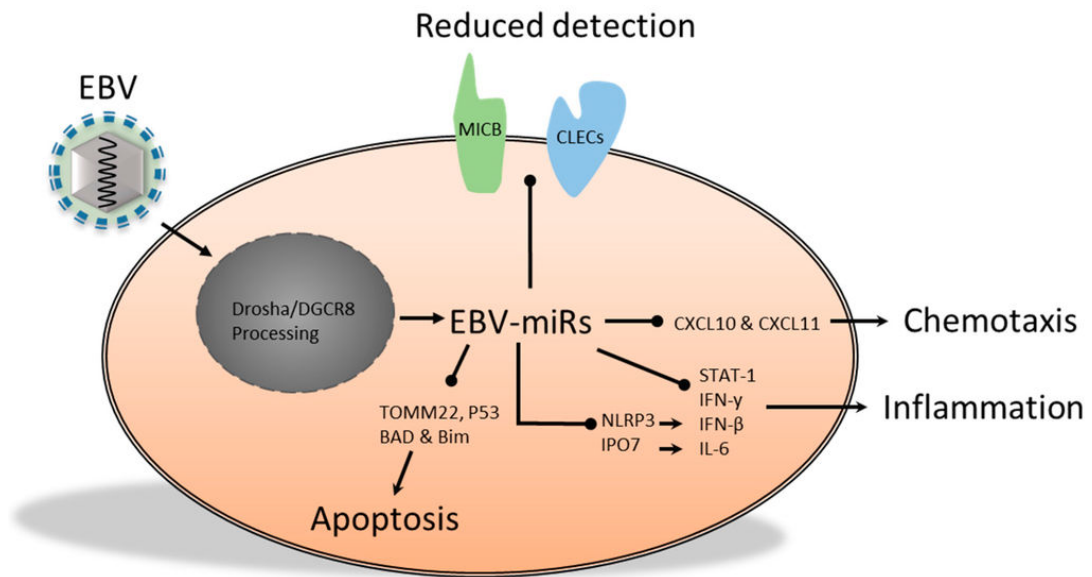


Figure 10 : Altération de l'expression de certaines protéines, de cytokines et de chimiokines dans différents types cellulaires par les miRNA de l'EBV. Ces altérations peuvent bénéficier à la persistance de l'EBV en affectant les processus pro-inflammatoires (inhibition de la détection par les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques), la signalisation des cytokines, la chimiotaxie et l'apoptose. MICB (MHC class I-related chain B), CLECs (C-type lectin domain family members), DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), TOMM22 (translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog), STAT (signal transducers and activators of transcription), BAD (Bcl-2-associated death promoter), Bim (Bcl-like protein 11), IPO7 (importin 7), CXCL (chimiokine (C-X-C motif) ligand), NLRP3 (NLR family, pyrin domain containing 3) (Flór and Blom, 2016).

III. 3) Les protéines nucléaires de latence

Les **protéines nucléaires virales de latence** sont les EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C et LP.

EBNA1, est codée par l'ORF BKRF1 et est retrouvée chez toutes les cellules infectées par l'EBV. Il s'agit d'une phosphoprotéine de 641 acides aminés (aa) riche en proline qui se lie à l'ADN et est transcrite à partir de 4 promoteurs différents : Wp, Cp, Qp et Fp. En latence I et II, où les promoteurs Wp et Cp sont réprimés par méthylation, il est transcrit à partir du promoteur Qp actif, alors qu'aux stades initiaux de la latence III il est transcrit à partir du promoteur Wp puis à partir du promoteur Cp après circularisation du génome. Fp est activé pendant le cycle lytique (Schaefer et al., 1995) (Saha and Robertson, 2011). EBNA1 est composée de 4 domaines : (1) Le domaine N-terminal est constitué de 89 aa riches en aa basiques ; (2) Le second domaine comprend 239 aa, est riche en glycine et en alanine et joue un rôle important dans les interactions intramoléculaires. Il permet d'inhiber la réponse T cytotoxique en empêchant la présentation des antigènes EBNA 1 aux molécules du CMH1

(Levitskaya et al., 1995). Sa suppression semble affecter les différentes fonctions connues d'EBNA1 ; (3) Le 3^{ème} domaine est court et riche en aa basiques et enfin, (4) le 4^{ème} domaine, situé dans la partie C-terminale, comprend les aa 459 à 607 est riche en aa hydrophiles, et contient une région responsable de sa dimérisation et de sa fixation à l'origine de réplication OriP, formée de deux régions cis (FR (family of repeat) et DS (dyad symmetry)) séparées par un fragment d'ADN d'environ 1 kb. EBNA1 est responsable de la maintenance du génome viral et essentiel aux activités transcriptionnelles et répliquatives (Gahn and Sugden, 1995) (Tsai et al., 1995) (Mackey and Sugden, 1999). La fixation d'EBNA1 sur la région DS d'OriP initie la synthèse de l'ADN, tandis que sa fixation sur le domaine FR, contenant des éléments amplificateurs qui peuvent réguler positivement la transcription lorsqu'il est lié à EBNA1, permet une régulation de la transcription (Leight and Sugden, 2000). EBNA1 peut également se fixer au promoteur du fragment BamHI C (Cp), permettant l'expression de tous les transcrits d'EBNAs (Gahn and Sugden, 1995) (Puglielli et al., 1996) ainsi qu'au promoteur du fragment BamHI Q (Qp) pour réguler sa propre expression, quelle que soit la phase de latence (Sample et al., 1992) (Nonkwelo et al., 1997). Il peut également réguler positivement l'expression de facteurs de transcription cellulaires tels que TFIIC, ATF-2 et c-Myc, induisant grâce à leur effet co-activateur l'expression des EBER1 et 2. Des modifications post-traductionnelles sont à l'origine de la régulation de la fonction et de la localisation nucléaire d'EBNA1. Il existe par ailleurs des répresseurs transcriptionnels d'EBNA1, tels que les facteurs cellulaires IRF2 et IRF7 (Zhang and Pagano, 1999). Cette protéine nucléaire ne semble pas jouer directement un rôle crucial dans la lymphomagenèse mais il s'agit de la seule protéine nucléaire virale exprimée dans l'ensemble des tumeurs associées à l'EBV (Giulino et al., 2011).

EBNA2 est codée par l'ORF BYRF-1 et est la première protéine produite après l'infection primaire par l'EBV (Zimber-Strobl and Strobl, 2001). Deux variantes à rôles similaires mais qui diffèrent par leur taille sont distinguées : EBNA2A (487 aa) et EBNA2B (443 aa), correspondant aux deux différentes souches d'EBV (EBV1 et EBV2) (Ling et al., 1993). La partie N-terminale, permettant à cette protéine de se trouver *in vivo* ou *in vitro* sous forme d'homodimères, est formée d'un domaine d'homo-dimérisation DIM (aa 1 à 58), suivi d'une région riche en proline (aa 58 à 97) et d'une région de taille variable en fonction du type de variant (aa 135-280 pour la forme la plus longue, EBNA2A) (Zimber-Strobl and Strobl, 2001). La partie C terminale est composée de 4 régions : (1) une région d'interaction avec le facteur CBF1/RBP-JKappa (C-promoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein

JKappa), (2) une seconde région riche en résidus arginine-glycine (RG, aa 341 à 355), (3) une 3^{ème} région contenant le domaine de transactivation TAD (aa 437 à 475) et (4) une 4^{ème} région contenant la séquence de translocation au noyau (NLS, aa 477 à 483). Une étude effectuée par Hammerschmidt (Hammerschmidt and Sugden, 1989), a montré que la souche virale P3HR-1 (mutant dépourvu de la région U2 codante pour EBNA2 au niveau du gène BYRF1 et d'une partie d'EBNA-LP) redevient immortalisant quand ce gène est restitué. De plus, l'inhibition de l'expression d'EBNA2 empêche la transformation des lymphocytes B (Dosch et al., 1990) (Cheung et al., 1993), montrant ainsi qu'EBNA2 est indispensable au processus d'immortalisation des lymphocytes B infectés par l'EBV (Cohen et al., 1989) (Hammerschmidt and Sugden, 1989). Ceci a lieu grâce à sa capacité à agir comme modulateur transcriptionnel de l'expression des gènes cellulaires et viraux de la latence III. Cette protéine agit comme un facteur de transcription primaire et régule l'expression d'autres gènes de latence par transactivation de leurs promoteurs viraux : le promoteur de LMP2A, le promoteur bidirectionnel de LMP1 et de LMP2B, ainsi que le promoteur Cp, qui régule la transcription des EBNAs (Abbot et al., 1990) (Zimber-Strobl et al., 1991). EBNA2 augmente également la transcription des deux marqueurs d'activation lymphocytaires B : le CD21 (récepteur de l'EBV) et le CD23 (marqueurs d'activation des lymphocytes B) (Cordier et al., 1990) (Laux et al., 1994), de la tyrosine kinase c-fgr (Knutson, 1990), du proto-oncogène c- myc (Kaiser et al., 1999) et de BAFT. C-fgr et c-myc contribuent à la régulation de la croissance tandis que BAFT est un membre de la famille AP-1/ATF, qui régule négativement l'expression de la protéine lytique Zta, inhibant l'entrée des cellules en cycle lytique (Johansen et al., 2003). De plus, son domaine puissant TAD lui permet d'interagir avec des composants multiples du complexe de transcription cellulaire, tel que l'ARN polymérase II (Tong et al., 1995). EBNA-2 ne se lie pas directement à l'ADN, son activité semble nécessiter l'association à des protéines cellulaires comme CBF1/RBP-jk (C-promoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein JK (Henkel et al., 1994). CBF1 est une protéine hautement conservée, jouant un rôle de répresseur de la transcription lorsqu'elle est fixée au complexe co-répresseur HDAC 1/2 (Histones Désacétylases 1 et 2) au niveau du promoteur de ses gènes cibles. Sa présence conduit au remodelage de la chromatine et empêche l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN. Par interaction avec EBNA2, le complexe HDAC/CBF1 est déplacé et la répression de la transcription levée (Hsieh and Hayward, 1995).

EBNAs-3 A, B et C (ou respectivement 3, 4 et 6), codées respectivement par trois gènes du fragment BamHI par les ORF BLRF3/BERF1, BERF2a/BERF2b et BERF3/BERF4 localisés

en tandem sur le génome viral, ces protéines sont transcrites à partir du promoteur Cp ou Wp (Hennessy et al., 1985) (Dillner et al., 1986) (Hennessy et al., 1986). Elles sont fortement hydrophiles (plus de 20% des aa sont chargés), possèdent une fréquence élevée en arginine et en lysine, responsables de leur localisation au niveau nucléaire. Leur homo ou hétéro-dimérisation est facilitée par la présence de résidus leucine, isoleucine ou valine. Les EBNA3 peuvent agir comme des répresseurs de transcription *via* l'interaction avec les protéines cellulaires CBF1 et/ou *via* le recrutement de répresseurs de transcription comme les HDAC 1 et 2 (Robertson et al., 1996a) (Radkov et al., 1999). Les EBNA3 conduisent au déplacement de CBF1 de leur cible situé sur l'ADN, inhibant ainsi le recrutement d'activateurs de transcription comme EBNA-2 et par suite l'activation de promoteurs latents, ce qui constitue une boucle de régulation au niveau de l'expression virale (Johannsen et al., 1995). Bien qu'elles soient issues du même fragment BamH1 et qu'elles possèdent de très fortes similitudes, ces 3 protéines ne jouent pas le même rôle. EBNA3A et 3C ont été montrés, par utilisation de virus recombinants, comme indispensables dans le processus d'immortalisation des cellules B *in vitro* lors de l'obtention de LCLs (Tomkinson et al., 1993). EBNA3C conduit en particulier à l'expression de CD21 (permettant la fixation de virus à la surface des cellules), ainsi qu'à celle de LMP-1 et de LMP-2B (Jiménez-Ramírez et al., 2006). EBNA3B joue un rôle de suppresseur de tumeurs, son inactivation favorise l'échappement au système immunitaire et la lymphomagenèse (White et al., 2012).

EBNA-LP (EBNA Leader Protein ou EBNA-5), codée par l'ORF BWRF1, est transcrite à partir du promoteur Wp. Sa partie N-terminale est composée de tandems répétés de 66 aa codés par les exons W1 et W2 (22 et 44 aa respectivement), alors que sa partie C-terminale comporte 45 aa et est codée par les deux exons Y1 et Y2. EBNA-LP joue un rôle important dans la croissance des LCLs *via* la surexpression et l'activation de la cycline D2, impliquée dans la transition G0/G1 (Jiang et al., 1991) (Allan et al., 1992). Elle n'est pas indispensable au processus d'immortalisation mais en augmente l'efficacité en activant le gène BNLF1 qui code pour la protéine de latence virale LMP-1 essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B, ceci suite à sa liaison à EBNA2 par les domaines W1 et W2, eux-mêmes régulés par phosphorylation au niveau des résidus sérine S35 et S63 (Harada and Kieff, 1997) (Nitsche et al., 1997) (Yokoyama et al., 2001). L'interaction d'EBNALP avec le p14^{ARF} (qui empêche la dégradation de p53) conduit à une diminution du niveau d'expression de p53 impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose, ce qui contribue à favoriser les processus de prolifération et à inhiber ceux associés à l'apoptose. Par ailleurs, une expression

de la forme tronquée d'EBNA-LP (isoforme tronquée Y1Y2) protège les cellules contre l'apoptose dépendante des caspases (Garibal et al., 2007).

III. 4) Les protéines membranaires de latence

Les **protéines membranaires virales de latence** sont les LMP-1, -2A et -2B.

LMP-1, codée par l'ORF BNLF1, est une protéine de 62 KDa dont la séquence primaire comporte 386 aa. Elle est constituée de 3 régions : (1) une courte région cytoplasmique N-terminale (24 aa) dont une séquence a été montrée comme étant nécessaire à la bonne orientation de LMP-1 dans la membrane (Izumi et al., 1994), (2) six domaines transmembranaires importants pour l'oligomérisation de la protéine (Gires et al., 1997) (Higuchi et al., 2001), pour sa localisation dans les rafts lipidiques, ainsi que pour sa signalisation, et (3) une longue queue C-terminale (200 aa) cytosolique permettant l'engagement de molécules effectrices grâce aux domaines CTAR1 et CTAR2 (C-terminal activation région 1 and 2), largement responsables de la signalisation de LMP1 (Yasui et al., 2004) (Soni et al., 2007) (Mainou et al., 2007). LMP1 semble être un récepteur constitutivement actif ne nécessitant pas de ligand, apparenté à la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) et à CD40. Ses signaux de transduction ont lieu à partir des domaines CTAR1 et CTAR2 de la partie C-terminale qui interagit avec les membres de la famille des TRAF (TNFR-associated factor) et avec TRADD (TNFR-associated death domain) (Izumi and Kieff, 1997) (Eliopoulos et al., 1997) (Kilger et al., 1998).

CTAR1 contient entre les aa 204 et 208 un site de liaison (PQQAT) qui peut interagir directement avec les adaptateurs de type TRAFs (TNF Receptor Associated Factor), en particulier les TRAFs 1, 2, 3 et 5. Cette région est également impliquée dans la signalisation du récepteur CD40, considéré comme l'équivalent cellulaire de LMP1. Cette dernière peut se substituer partiellement à CD40 chez des souris transgéniques qui en sont dépourvues et intervenir dans la transduction du signal en formant des complexes d'hétéromères et en recrutant en aval des molécules de signalisation pouvant intervenir par exemple dans l'induction de la croissance cellulaire, l'apoptose, ou l'activation de la voie NF- κ B (Mosialos et al., 1995) (Devergne et al., 1996) (Uchida et al., 1999) (Xie et al., 2008) (Hömig-Hölzel et al., 2008).

CTAR2 interagit avec les TRAFs d'une manière indirecte via les protéines adaptatrices TRADD (TNF receptor Associated Death), RIP (receptor-interacting protein) et BS69

recrutées pour s'associer avec les TRAFs 2 et 6 (Izumi et al., 1999). Suite au recrutement de ces nombreux adaptateurs (TRAFs, TRADD, RIP,...), LMP1 peut interagir avec de nombreuses protéines et activer différentes voies de signalisation cellulaire, il s'agit essentiellement des voies NF- κ B, PI3K/Akt et p38/JNK. L'induction des facteurs de transcription NF- κ B et API par LMP1 est impliquée dans le développement embryonnaire et l'oncogenèse (Eliopoulos and Young, 1998). Parmi les protéines codées par l'EBV, LMP1 et EBNA1 montrent des propriétés oncogéniques *in vitro* et *in vivo*. LMP1 est essentielle pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* par l'EBV (Kaye et al., 1993). Elle permet d'induire certains marqueurs membranaires comme l'antigène CD23 (en coopération avec la protéine EBNA2), les molécules d'adhésion ICAM, LFA-1 et LFA-3 et les antigènes du CMH II (Mosialos et al., 1995). LMP-1 peut agir sur l'expression d'autres gènes cellulaires tels que EGF-R (Epithelial Growth Factor Receptor), les facteurs anti-apoptotiques bcl-2, Mcl-1 et A20 (Takeshita *et al.*, 1999) et des molécules de la voie de transduction JAK/STAT. Il est à noter qu'une forme tronquée de LMP-1 exprimée en phase tardive du cycle lytique est retrouvée dans le virion, il s'agit de **LyLMP-1**. Cette dernière est traduite à partir du site d'initiation interne situé au niveau de la méthionine 129, correspondant à la délétion complète de la partie N-terminale et des 4 premiers domaines transmembranaires de LMP-1. Elle est détectée lors de l'infection par l'EBV et lors de la réactivation (Erickson and Martin, 1997), elle est non oncogénique dans les cellules épithéliales et inhibe la voie de signalisation NF- κ B induite par LMP-1 (Erickson and Martin, 2000). De plus, LyLMP-1 inhibe les propriétés oncogéniques de LMP-1 et diminue sa demi-vie (Pandya and Walling, 2004) (Pandya and Walling, 2006). Elle peut être considérée comme un dominant négatif naturel de LMP-1. Il a pu être élaboré le modèle dominant négatif LMP-1-CT, également délété des parties N-terminales et transmembranaires, ce qui suggère que la protéine tronquée capte les protéines adaptatrices dans le cytoplasme mais ne transduit pas le signal par absence de son oligomérisation (Adriaenssens et al., 2004).

Les protéines **LMP-2s** (LMP-2A et LMP-2B ou TP1 et TP2 : Terminal Protein), sont 2 protéines codées par le même gène mais présentant un épissage alternatif : contrairement à LMP-2A, LMP-2B est tronquée de sa partie N-terminale permettant la signalisation. Leur transcription ne peut se faire que lorsque le génome est sous forme circulaire car elle est initiée au niveau des régions répétées terminales. Elles possèdent douze domaines transmembranaires, suivis d'un domaine carboxy-terminal transmembranaire hydrophile. Les LMP-2s sont colocalisés avec LMP-1, avec laquelle elles peuvent interagir, mais ne sont pas

indispensables à l'immortalisation *in vitro* des cellules B (Speck *et al.*, 1999) (Longnecker *et al.*, 1991). LMP-2A est plus étudiée que LMP-2B, elle donne un signal de survie à la cellule hôte, empêche le passage de la latence au cycle lytique, mime le BCR (B cell receptor) et agit comme un dominant négatif bloquant leur activité (Dykstra *et al.*, 2001).

LMP-2A ne présente pas de propriétés oncogéniques mais donne aux lymphocytes B un signal de survie leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (Caldwell *et al.*, 1998) (Mancao and Hammerschmidt, 2007). Son interaction avec la protéine MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) a été démontrée, sans qu'aucune fonction particulière ne soit identifiée (Panousis & Rowe, 1997).

LMP-2A bloque la mobilisation du calcium et par conséquent la réactivation du cycle viral induite par l'association d'un ligand avec le BCR, ce qui permet la persistance de l'EBV en phase latente dans les cellules B (Miller *et al.*, 1994).

LMP-2A interagit également par son motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) avec les tyrosines kinases Lyn et Syk de la signalisation du BCR permettant d'augmenter la dégradation de ces kinases et d'induire le blocage de la signalisation du BCR.

Enfin, LMP-2A étant localisée dans les radeaux lipidiques, elle bloque la translocation du BCR dans ces micros domaines et l'internalisation du complexe BCR/antigène (Winberg *et al.*, 2000) (Dykstra *et al.*, 2001). LMP-2B modulerait l'agrégation de LMP-2A et régulerait négativement ses fonctions (Longnecker, 2000).

IV. Réactivation de l'EBV

IV. 1) Réactivation et cycle lytique

La réactivation virale est la commutation de la forme latente virale en forme lytique. Elle correspond à la phase de réplication du virus, au cours de laquelle les machineries enzymatiques virale et cellulaire sont exploitées pour, répliquer le génome viral linéaire extrachromosomique, exprimer les protéines du cycle lytique et produire de nouveaux virions infectieux. Ceci conduit généralement à la mort de la cellule hôte, d'où la qualification de cycle lytique. Cette phase lytique permet la transmission du virus entre les individus et également de renforcer le pool de cellules B mémoires porteuses du virus (Young *et al.*, 1991) (**Figure 11**).

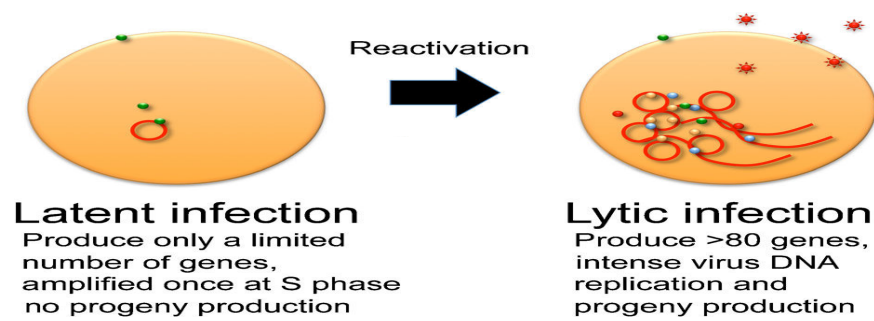


Figure 11 : Le cycle de vie biphasique de l'EBV. L'infection à EBV peut être sous forme latente ou lytique. Durant la latence, le virus produit un nombre limité de gènes. Les produits de ces gènes sont schématisés par les cercles verts. Durant la réplication lytique, plus de 80 gènes viraux sont produits. Les produits de ces gènes schématisés par des cercles bleus, rouges et jaunes. Ils permettent une réplication intense de l'ADN viral et par la suite la production de virions (d'après Murata, 2014).

IV. 1. 1) Réactivation naturelle de l'EBV

Les signaux physiologiques conduisent à la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes sécréteurs contribuent à la réactivation du virus. Cette capacité des cellules B mémoires infectées à se transformer en plasmocytes où le virus se réplique a été étudiée par Al Tabaa et al. (Al Tabaa et al., 2009).

IV. 1. 2) Induction de la réactivation de l'EBV *in vitro*

Différents moyens existent pour induire le cycle lytique, *in vitro*, à partir de cellules infectées par l'EBV de manière latente. La réactivation du virus a été étudiée de manière approfondie grâce à des stimulations chimiques par des esters de phorbol tel que le TPA ou 12-O-Tétradecanoyl Phorbol-13-Acétate qui est un activateur de la protéine kinase C (PKC) (Zur Hausen et al., 1978) (Luka et al., 1986)). Il est également possible d'induire le cycle lytique par différents traitements comme les HDACi (tel que l'acide butyrique) (Ghosh et al., 2012), les glucocorticoïdes (Bauer, 1983), les anti-immunoglobulines de surface (Takada and Ono, 1989) ainsi que par le TGF β (inducteur du cycle lytique dans des lignées de lymphome de Burkitt par un mécanisme dépendant de la protéine kinase ERK) (Fahmi et al., 2000). Ces inducteurs activent la transcription des gènes viraux lytiques très précoces *BZLF1* et *BRLF1*. Cette induction est plus ou moins intense selon les agents et les lignées utilisées et des actions synergétiques de ces inducteurs peuvent être utilisées (**Figure 12**).

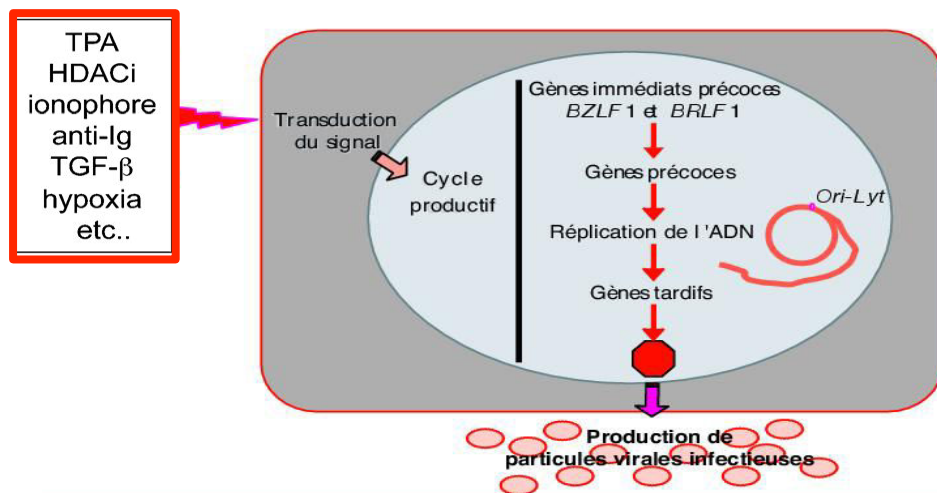


Figure 12 : Induction *in vitro* du cycle productif de l'EBV par divers agents. La réactivation de l'EBV dans les cellules infectées de manière latente peut être induite par divers agents. Ces derniers activent l'expression en cascade de gènes du cycle lytique de l'EBV. Les produits des gènes très précoces activent l'expression des gènes précoces induisant la réplication du génome viral suivant un modèle dit «en cercle roulant» nécessaire à la transcription des gènes tardifs. Les produits de ces gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses. L'encapsidation de l'ADN viral a lieu dans le noyau de la cellule. La sortie des particules virales se fait par lyse de la cellule hôte (modifiée d'après Manet et al., 2003).

IV. 1. 3) Réplication productive et cycle lytique

Les synthèses conduisant à la fabrication de nouveaux virions ne se produisent que chez un petit nombre de lymphocytes B. Les gènes dits « très précoces » du génome viral, notamment les gènes des facteurs de transcription nucléaires (*BZLF1* et *BRLF1*), seront alors transcrits. Ceci conduit à l'activation de l'expression des gènes précoces, dont certains produits (comme l'ADN-polymérase virale et d'autres enzymes responsables de la synthèse de l'ADN) contribuent à la réplication de l'ADN viral à partir de l'origine de réplication « lytique » (ou Ori-Lyt). Les gènes tardifs seront alors transcrits à partir de ces nouvelles molécules linéaires du génome de l'EBV. Les protéines tardives synthétisées sont celles de la capsid et les glycoprotéines de l'enveloppe (Kenney and Mertz, 2014a). La capsid virale s'assemble dans le noyau. La molécule de génome obtenue après réplication (ADN viral linéaire) pénètre à l'intérieur de la capsid pour constituer la nucléocapsid. Ceci nécessite une protéase codée par l'EBV. Les nucléocapsides subissent un envelopement par la membrane interne nucléaire puis un désenveloppement par la membrane externe nucléaire, leur permettant de sortir du noyau. Par ailleurs, la glycosylation des glycoprotéines de l'enveloppe virale se fait dans le reticulum puis dans le golgi. Ces glycoprotéines s'accumulent dans les vésicules post-

golgiennes qui vont ensuite internaliser les nucléocapsides, en même temps que se met en place le téguement. La fusion de la vésicule golgienne avec la membrane plasmique permet enfin le relargage du virion dans l'espace extracellulaire (**Figure 12 et 13**).

L'ensemble de ce phénomène de réplication virale se produit essentiellement dans les lymphocytes B mémoires lors de leur différenciation en plasmocytes. Cette différenciation conduit les cellules vers les épithéliums muqueux, comme les amygdales, où il y a relargage de particules virales dans la salive, ce qui permet la transmission inter-individus.

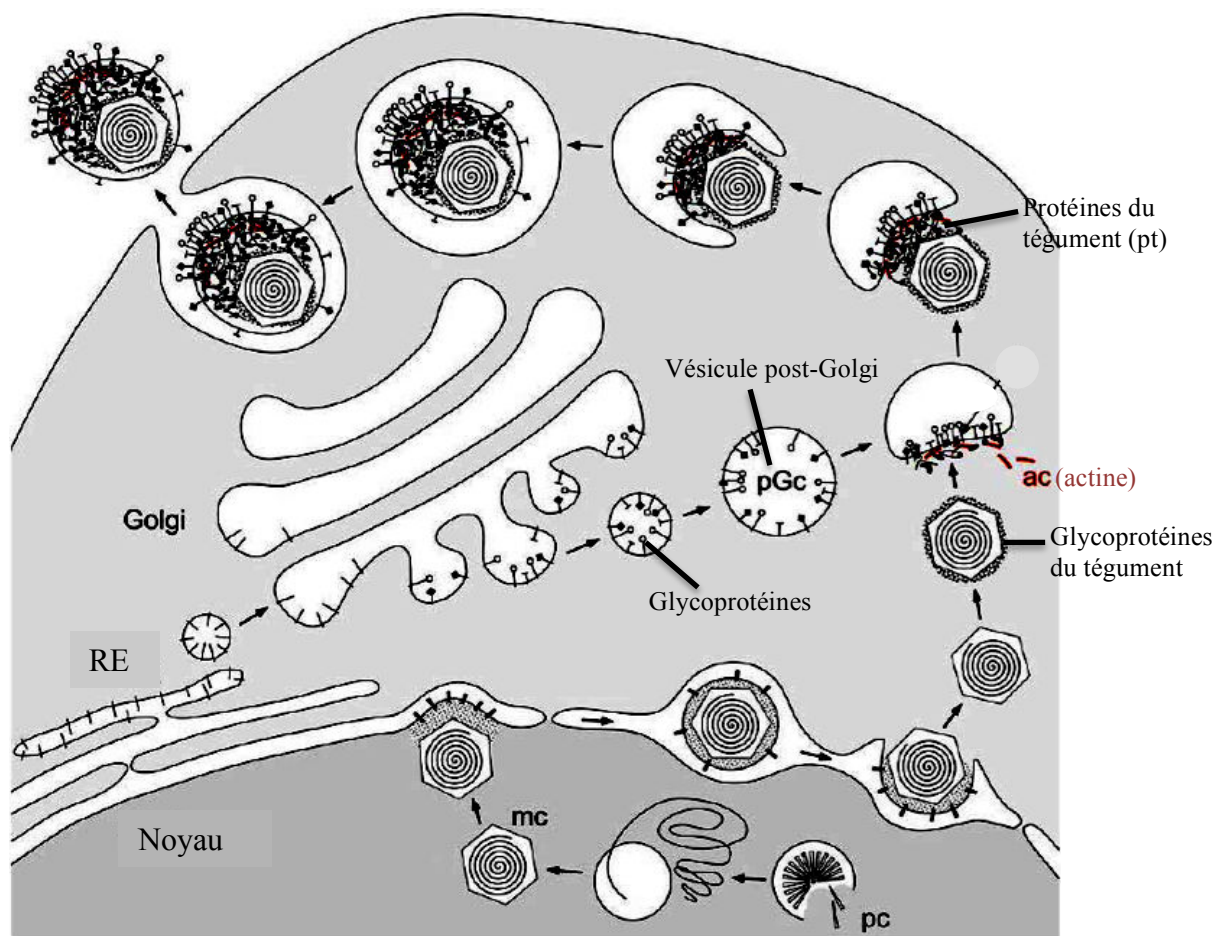


Figure 13 : Représentation schématique du processus d'assemblage et de relargage du virion. Les précurseurs de capsides (pc) s'assemblent dans le noyau. L'ADN viral (génome linéaire) est empaqueté formant des nucléocapsides mûres (mc) qui sortent du noyau par enveloppement de la membrane nucléaire interne et désenveloppement de la membrane nucléaire externe. Les glycoprotéines virales s'accumulent dans des vésicules post-Golgi (pGc). L'enveloppement secondaire est déclenché par l'interaction de la nucléocapside et/ou des protéines du téguement (pt) avec les domaines intra- cytosoliques des glycoprotéines regroupées à un emplacement spécialisé (impliquant peut-être des radeaux lipidiques). Des protéines du téguement (pt) sont recrutées sur un échafaudage se prolongeant entre la capside et la membrane dans un processus pouvant impliquer les microfilaments d'actine (ac). La nucléocapside et son téguement sont ensuite internalisés dans la pGc. Finalement, les virions

sont relargués dans l'espace extracellulaire par fusion de la membrane externe de la pGc avec la membrane plasmique. ER :Reticulum endoplasmique (modifiée d'après Grünewald et al., 2003).

IV. 2) Gènes et protéines du cycle lytique productif

L'expression des gènes lytiques se fait de manière séquentielle et ordonnée. En effet, comme pour la majorité des virus à ADN doubles brins, le déclenchement d'un cycle viral productif nécessite au préalable la synthèse de protéines trans-activatrices dites très précoces et codées par le virus. Pour l'EBV, il s'agit des protéines ZEBRA et Rta. Ces 2 dernières vont activer la transcription de tous les gènes précoces du virus dont, pour certains, les produits sont impliqués dans la réplication du génome viral nécessaire à la transcription des gènes tardifs. Les produits de ces gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses.

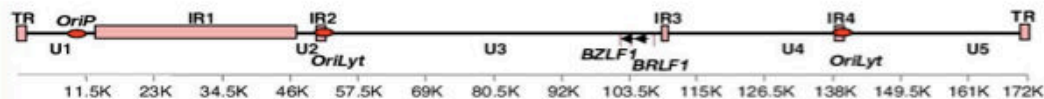
IV. 2. 1) Identification et caractérisation des gènes et protéines très précoces

Les protéines ZEBRA (BamHI fragment Z Epstein-Barr Replication Activator, également appelée Zta, Z ou EB1) et Rta (ou R), sont codées respectivement par les gènes *BZLF1* et *BRLF1*. Il s'agit de facteurs de transcription déclenchant toute la cascade d'expression des gènes du cycle lytique par transactivation des promoteurs des gènes précoces, ainsi que leurs propres promoteurs.

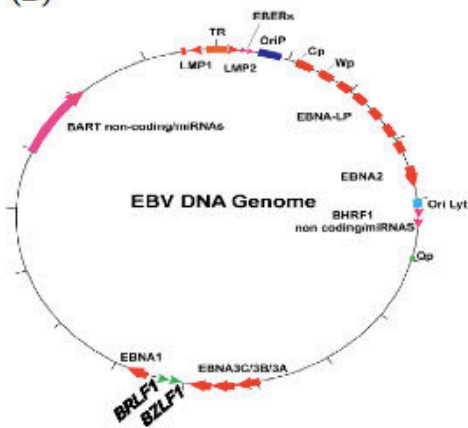
Suite à l'étude de la lignée cellulaire P3HR1, issue d'un lymphome de Burkitt et produisant spontanément des particules virales, le groupe de G. Miller a suggéré pour la première fois le rôle du gène *BZLF1* dans l'initiation du cycle productif de l'EBV. En effet, une sous-population de cellules de cette lignée porte un génome viral réarrangé, appelé « ADN hétérogène » ou « ADN het » dans lesquels la phase de lecture ouverte correspondant au gène *BZLF1* se trouve sous le contrôle du promoteur d'un gène viral exprimé en latence. Ceci conduit à la production de la protéine ZEBRA de manière constitutive. D'autres part, d'autres travaux ont montré que l'expression ectopique de la protéine ZEBRA dans des cellules B infectées par l'EBV est effectivement capable d'induire le cycle viral productif dans les cellules Raji (Chevallier-Greco et al., 1986). La nécessité de la protéine Rta, codée par le gène *BRLF1*, a été montrée comme indispensable pour pouvoir activer efficacement l'expression des gènes précoces du virus par la suite (Chevallier-Greco et al., 1989).

La construction et le criblage de banques d'ADNc a permis d'obtenir des ADNc complets pour chacun des ARNm synthétisés au niveau de la région portant les gènes *BZLF1/BRLF1*. Leur analyse a permis d'identifier trois ARNm majeurs de 1, 3 et 4 kb, un ARNm minoritaire de 0,9 kb et un ARNm appelé Na (Manet et al., 1989). La transcription du messager de 1 kb est sous le contrôle d'un promoteur appelé pZ. Il s'agit d'un messager monocistronique qui ne contient que la phase de lecture *BZLF1*, à partir de laquelle seule la protéine ZEBRA est produite. D'autres part, les messagers de 3 et 4 kb sont produits sous le contrôle d'un promoteur appelé pR. Il s'agit de deux messagers bicistroniques générés par épissage facultatif d'une région non codante. Ils contiennent à la fois les phases de lecture *BZLF1* et *BRLF1*, mais seule la protéine Rta semble être produite à partir de ces ARNm. L'ARNm minoritaire de 0,9 kb permet l'expression d'une protéine appelée RAZ qui est une protéine de fusion entre les 81 résidus N-terminaux de la protéine Rta et les 159 résidus C-terminaux de la protéine ZEBRA. RAZ a été ultérieurement décrite comme pouvant être un dominant négatif potentiel de la protéine ZEBRA (Segouffin et al., 1996). Enfin, l'ARNm Na contient la phase de lecture ouverte *BRRF1* dont le produit est une protéine précoce jouant le rôle de facteur de transcription qui active le promoteur IE EBV Zp par ses effets sur c-Jun. Na joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes lytiques dans les cellules épithéliales et ceci nécessite de plus l'intervention des protéines cellulaires TRAF2 et p53 (Segouffin-Cariou et al., 2000) (Hong et al., 2004) (Hagemeier et al., 2011) (Hagemeier et al., 2012) (**Figure 14**). Une présentation plus détaillée de ZEBRA et Rta est faite par la suite.

(A)



(B)



(C)

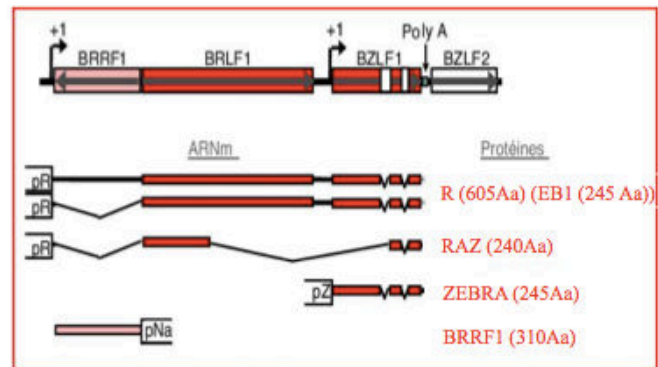


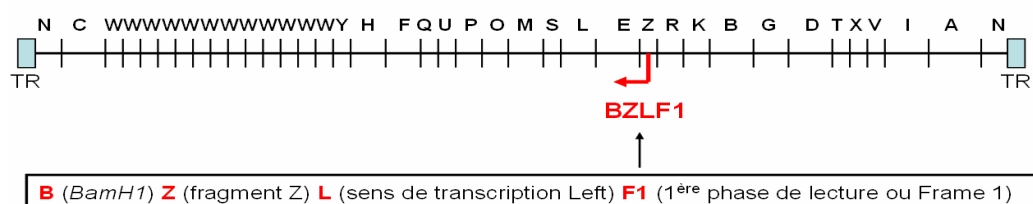
Figure 14 : Localisation des gènes *BZLF1* et *BRLF1* dans les structure schématiques linéaire et épisomique de l'organisation du génome de l'EBV et structure des ARNm produits dans la région *BZLF1/BRLF1*. (A) Structure schématique linéaire du génome d'EBV. Les positions des origines de réplication, OriP (utilisée durant la phase de latence virale) et OriLyt (utilisées pendant la phase productive du cycle viral) sont indiquées. Une échelle de taille en kpb est également précisée. IR : internal repeat, TR : terminal repeat, U : unique region. La position des gènes *BZLF1* et *BRLF1* est également indiquée (modifié d'après Manet et al., 2003). (B) Structure schématique épisomique du génome de l'EBV. Les positions de l'origine de réplication de latence (OriP), des promoteurs de gènes de latence (Cp, Wp et Qp), des gènes de latence (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C et LP ; LMP1 et 2), des ARN de latence (BART et EBER), de l'origine de réplication lytique (OriLyt), des gènes lytiques très précoce *BZLF1* et *BRLF1* et du gène lytique précoce *BHRF1* sont indiquées (modifié d'après Kenney and Mertz, 2014a). (C) Structure des ARNm produits dans la région *BZLF1/BRLF1* du génome de l'EBV. L'orientation relative des différents gènes présents dans cette région est schématisée par une flèche noire. La position des sites d'initiation (+ 1) et de polyadénylation (poly A) des ARNm correspondant aux gènes *BZLF1* et *BRLF1* sont également indiqués. pZ, pR et pNa sont les promoteurs respectifs des gènes *BZLF1*, *BRLF1* et *BRRF1*. La structure des différents ARNm produits dans cette région est schématisée. Les introns sont indiqués par des lignes obliques. Les phases de lecture ouvertes sont repérées par des rectangles de couleur. Le nom et la taille en aa des protéines synthétisées à partir de ces ARNm sont indiqués (R/Rta, EB1/ZEBRA, RAZ, BRRF1) (d'après Manet et al., 2003).

IV. 2. 1. 1) ZEBRA

ZEBRA, la première protéine virale exprimée lors de la réactivation du cycle lytique de l'EBV, semble être la protéine clef de la transactivation. Il s'agit d'une protéine homodimérique de 245 aa qui appartient à la famille des transactivateurs bZIP

(basique/leucine Zipper), avec les facteurs cellulaires c-jun et c-Fos. Ce facteur de transcription est capable de se fixer sous forme d'homodimère à l'ADN sur des motifs consensus de type AP1 et des motifs spécifiques ZRE (Z Responsive Elements) (Packham et al., 1990). Elle possède un site de dimérisation, un site de fixation à l'ADN, reconnaissant des séquences ZRE (Z-Responsive Elements) et un site transactivateur (Dreyfus et al., 2011). Sa région C-terminale contient un domaine riche en résidus basiques homologue au domaine de fixation à l'ADN de la protéine Fos. Adjacent à ce domaine, se trouve un domaine adoptant une structure de type « coiled-coil » permettant à la protéine de former des homodimères. ZEBRA interagit avec des sites dont la séquence est relativement dégénérée autour du consensus suivant : TGA/TGT/CC/AA. Plusieurs de ces sites de fixation sont présents sur les promoteurs des gènes précoces de l'EBV et probablement aussi sur les promoteurs de différents gènes cellulaires. Le domaine d'activation de la transcription de la protéine est, quant à lui, localisé dans la partie N- terminale (**Figure 15**).

(A)



(B)

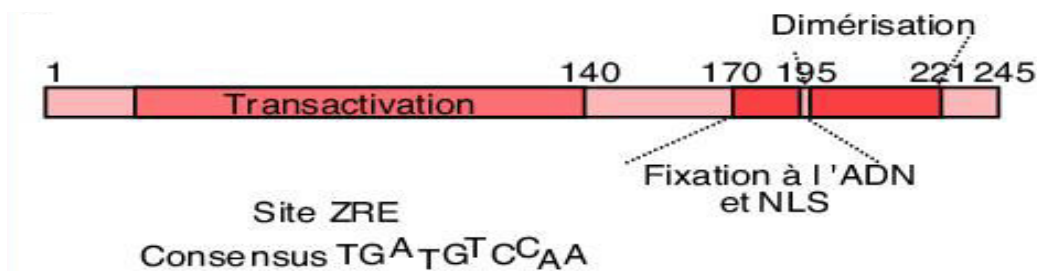


Figure 15 : Localisation du gène *BZLF1* et structure de sa protéine. (A) carte de restriction du génome virale obtenue après digestion enzymatique par BamHI. Les gènes de l'EBV sont annotés par ordre alphabétique de A à Z suivant la taille des fragments générés après digestion par *BamHI* (A étant le plus grand fragment). TR : terminal repeat ; (B) Structure schématique de la protéine transactivatrice ZEBRA. Il s'agit d'une protéine de 245 aa codée par le gène *BZLF1*. Sa partie N- terminale contient le domaine d'activation de la transcription. Sa partie C-terminale contient le domaine de fixation à l'ADN (position 170 à 195) qui porte aussi le signal de localisation nucléaire (NLS) et le domaine de dimérisation de la protéine (position 195 à 221). La séquence consensus de fixation de cette protéine sur l'ADN est indiquée (d'après Manet et al., 2003).

L'expression du gène *BZLF1* peut être régulée de manière positive ou négative par la fixation de facteurs cellulaires sur les séquences régulatrices de son promoteur Zp, tel que C/EBPα ou MEF2-D. Dans le modèle lymphocytaire, les facteurs de transcription reliés au promoteur permettant l'expression de *BZLF1* seraient déjà présents pendant la latence (hormis ceux qui sont positivement corrélés à la réactivation virale et exprimés durant la différenciation plasmocytaire, comme XBP-1, BLIMP-1 ou KLF4) mais ne seraient activés que lors du déclenchement de la réplication par des modifications épigénétiques. Ces dernières seraient des méthylations du promoteur ou des modifications d'acétylation des histones (McDonald et al., 2010) (Takacs et al., 2010).

L'expression ectopique de ZEBRA dans des cellules infectées par l'EBV est suffisante pour induire le cycle productif du virus, quel que soit le type cellulaire. Cette protéine joue un rôle sur la levée de la latence en inhibant l'activité de plusieurs promoteurs latents, en activant son propre promoteur et ceux des gènes précoces et en étant essentielle à l'activité des origines de réplication lytique (Ori Lyt). Dans la mesure où ZEBRA est l'initiateur principal du cycle lytique de l'EBV, la régulation de son expression est un point critique sur lequel beaucoup d'études se sont concentrées. Il est en fait important de rechercher, d'identifier et de caractériser tous les partenaires cellulaires de cette protéine virale clef, afin de mieux comprendre sa régulation et le mécanisme d'interaction de l'EBV, lors de la réactivation du cycle lytique. Ceci permettrait de trouver des molécules qui activent ou répriment le cycle lytique et de les utiliser à des fins thérapeutiques (Petosa et al., 2006). La régulation de l'expression de ZEBRA est un point qui sera développé ultérieurement.

ZEBRA pourrait interagir avec des fonctions essentielles de la cellule, dans la mesure où il a été montré qu'elle peut activer la transcription de différents gènes cellulaires (MMP9), interagir avec différentes protéines cellulaires (la protéine suppresseur de tumeur p53, la sous-unité p65 de NF-κB, le récepteur à l'acide rétinoïque RXRα/RARα, l'histone acétylase CBP) et bloquer le cycle cellulaire de certaines cellules épithéliales en phase G0/G1 (Adamson and Kenney, 1999) (Yoshizaki et al., 1999).

Une particularité de ZEBRA est sa capacité à se fixer préférentiellement sur les promoteurs de gènes méthylés mis sous silence épigénétique et incapables d'être transcrits (Bhende et al., 2004). Ce mécanisme surprenant permet à l'EBV de surmonter la répression des gènes viraux et de se répliquer. Dans les lymphocytes B infectés par l'EBV, l'ADN viral est méthylé et la majorité des gènes réprimés. La synthèse de nouveaux virions est également inhibée.

ZEBRA joue un rôle important dans la réplication de l'ADN de l'EBV lors du cycle lytique productif, en se liant directement à une série de sites ZRE situés dans l'origine de réplication lytique oriLyt. Son rôle dans cette médiation de réplication (durant laquelle des interactions directes entre ZEBRA et les protéines fondamentales de réplication virale favorise la formation de complexes de réplication), est distinct de ses fonctions de transcription (di Renzo et al., 1994).

ZEBRA a de plus la capacité à traverser les membranes cellulaires grâce au domaine minimum correspondant aux aa 170-220 (Mahot et al., 2005). Ce domaine a été fusionné à différentes protéines comme la GFP. Le mécanisme d'internalisation s'est montré efficace dans différentes lignées cellulaires, par translocation directe à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Ceci a une application potentielle en thérapeutique, en permettant la délivrance efficace dans les cellules de protéines biologiquement actives au sein des cellules. Des modifications post-traductionnelles de ZEBRA peuvent activer (phosphorylation) ou inhiber (oxydation, S-nitrosylation, sumoylation) ses fonctions (Hagemeier et al., 2010) (Wang et al., 2005). La production d'oxyde nitrique (NO) dans des lignées lymphoblastoïdes a par ailleurs été associée à une inhibition de la réactivation virale (Mannick et al., 1994).

IV. 2. 1. 2) Rta

Rta (également appelée protéine R) apparaît très tôt durant le cycle lytique, grâce à l'activation de son expression par ZEBRA. Elle est traduite, à partir d'un ARNm bicistronique transcrit à partir du promoteur pR activé par ZEBRA et non pas par Rta, même si ses transcrits contiennent l'ORF de ZEBRA (Manet et al., 1989) (Manet et al., 2003). Il s'agit d'un facteur de transcription de 605 aa et 92 kDa agissant sous forme de dimère en se fixant sur des motifs d'ADN spécifiques dits « R Responsive Element » ou RRE, présents au niveau de nombreux promoteurs de gènes précoces (Manet et al., 1991) (Gruffat and Sergeant, 1994). Les sites de fixation de Rta sur l'ADN sont très variables mais une séquence consensus de fixation a pu être établie à partir de sites caractérisés fonctionnellement dans le génome viral et de sites sélectionnés par la méthode dite de « CASTing » (cyclic amplification of selected target). La séquence consensus riche en GC est : 5'-GNCC(N)9GGNG-3'. Rta s'associe simultanément et sous forme homodimérique aux deux séquences d'ADN GNCC et GGNG, situées du même côté de la double hélice d'ADN (Gruffat and Sergeant, 1994).

Un domaine N-terminal minimum de 232 aa, nécessaire à l'homodimérisation de Rta, a pu être identifié suite à des expériences de mutagenèse dans la protéine. L'extension de ce domaine aux 280 aa N-terminaux s'est révélée être suffisante pour la fixation de la protéine à l'ADN. Par ailleurs, la partie C-terminale de Rta porte sa fonction activatrice proprement dite. La structure primaire de ce domaine activateur est caractérisée par une région C-terminale de 90 aa, particulièrement acide, composée de deux hélices α putatives appelées A1 et A2 et d'une région comprise entre les aa 352 et 500 particulièrement riche en résidus proline (20 à 30 % de résidus proline). L'hélice A2 est un domaine activateur par lui-même, dont l'activité est augmentée par la présence du domaine A1. La région riche en proline n'est pas capable d'activer seule la transcription, mais potentialise l'activation liée à l'hélice A2 (Manet et al., 1993) (Manet et al., 2003) (**Figure 16**).

In vitro, Rta interagit directement par sa région C-terminale avec le facteur TFIIB (transcription factor IIB), essentiel à la détermination du site de démarrage de la transcription (+ 1) et au recrutement de l'ARN polymérase II dans le complexe de pré-initiation, par l'intermédiaire de TFIIF. Rta interagit aussi, mais avec une affinité moindre, avec le facteur TBP (TATA binding protein), essentiel à la nucléation du complexe d'initiation de la transcription (Manet et al., 1993). La possibilité d'interactions entre Rta et une ou plusieurs des protéines associées au facteur TBP dénommées TAF n'a jamais été explorée et permettrait de parfaire le modèle d'activation de la transcription par la protéine Rta.

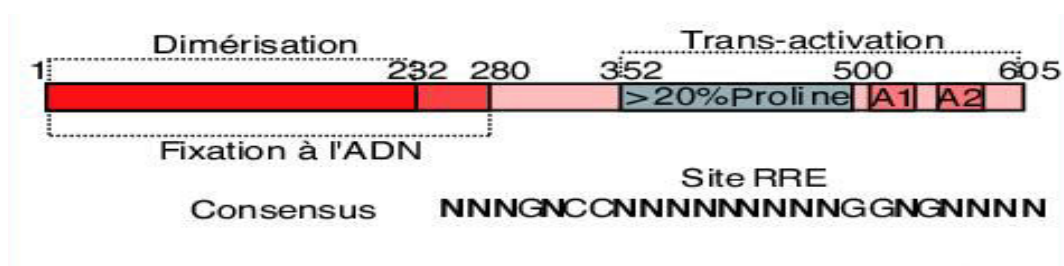


Figure 16 : Structure schématique de la protéine Rta. Il s'agit d'une protéine transactivatrice de 605 aa codée par le gène *BRLF1*. Sa partie N-terminale contient les domaines de dimérisation (position 1 à 232) et de fixation à l'ADN (position 1 à 280). Le domaine d'activation de la transcription se trouve entre les positions 352 et 605. Il peut être divisé en trois sous domaines : une région riche en résidus proline (position 352 à 500 aa) et une région riche en résidus acides (A1) qui potentialisent l'activité transactivatrice de la 3^{ème} région, A2. La séquence consensus de fixation sur l'ADN de la protéine Rta est indiquée. La protéine se fixe sous forme de dimère en interagissant avec les deux éléments de séquence marqués en gras (Manet et al., 2003).

Bien que Rta joue un rôle très important dans le déroulement du cycle productif de l'EBV, ce n'est pas cette protéine qui est considérée comme pourrnt l'amorcer, ce rôle est dévolu à ZEBRA. Contrairement aux cellules B, l'expression ectopique de Rta dans des cellules épithéliales infectées par l'EBV est toutefois suffisante pour induire le cycle productif du virus. Ceci peut-être dû au fait que Rta peut induire l'expression de ZEBRA, ce qui n'est pas le cas dans la majorité des cellules lymphoïdes infectées par l'EBV (Zalani et al., 1996) (Westphal et al., 1999). De manière intéressante, des protéines homologues à Rta (protéines ORF50) ont été montrées comme étant les clés du passage de la latence au cycle viral productif chez deux autres Gamma herpesvirinae HHV-8 et MHV68. Un homologue structural de la protéine ZEBRA a également été décrit chez HHV-8 (Gruffat et al., 1999) (Adamson et al., 2000) (Darr et al., 2001) (Ragoczy and Miller, 2001) (Chang et al., 2005) (Heilmann et al., 2012).

Rta peut se lier également à l'oriLyt, bien qu'il ne semble pas être indispensable à la réplication génomique (Gruffat and Sergeant, 1994). Il peut agir au niveau de certains promoteurs de façon synergique avec ZEBRA (Cox et al., 1990) (Giot et al., 1991) et être activé avec la protéine précoce Na par ZEBRA, via la méthylation de leurs promoteurs. Ceci peut induire par la suite la transcription de ZEBRA par un processus de boucle positive (Dickerson et al., 2009). De plus, une interaction entre Rta et la protéine Rb (Rétinoblastome) a été mise en évidence dans les cellules Akata (suite à l'induction de Rta) et semble avoir une incidence sur le cycle cellulaire conduisant à une facilitation de la réplication du génome viral (Zacny et al., 1998).

IV. 2. 2) Régulation de l'expression du gène très précoce *BZLF1*

IV. 2. 2. 1) Promoteur de *BZLF1*

Le promoteur de *BZLF1* (Zp) est activé ou inhibé par des facteurs cellulaires. Il contient des motifs qui se lient à des facteurs activant sa transcription (cis-acting motifs) ou l'inhibant (negative cis-element). Le motif ZI peut être soit activateur, soit inhibiteur, selon le facteur de transcription qui lui est attaché, tandis que les motifs ZII et ZIII sont toujours activateurs. Il existe quatre motifs ZI qui sont ZIA, ZIB, ZIC et ZID, un motif ZII activateur et deux motifs ZIII différents, de type ZIIIA et ZIIIB. Il existe également les motifs SBEs qui sont considérés comme inducteurs de la réactivation. Concernant les motifs inhibiteurs de la transcription, On trouve ZV, ZV', ZIIR (adjacent à ZII), ZIV et HI. Les facteurs cellulaires qui se fixent à ces motifs pour induire ou inhiber l'expression de *BZLF1* seront décrits

ultérieurement. Il a été démontré que la séquence minimale de Zp, dénommée « Zp minimal », qui va des pb -221 à +12 par rapport au point de départ de la transcription, suffit à elle seule pour déclencher la réponse aux inducteurs chimiques (Flemington and Speck, 1990a) (**Figure 17**).

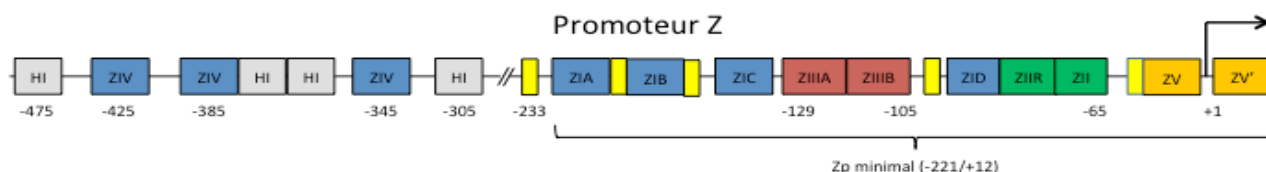


Figure 17 : Représentation schématique du promoteur Z de BZLF1. La séquence allant des paires de base -221 à + 12 est appelée séquence « Zp minimale » et suffit à déclencher la réponse aux inducteurs chimiques. Elle comporte 4 motifs ZI riches en séquences A-T : ZIA, ZIB, ZIC et ZID représentés en bleu (éléments de liaison à Sp1, Sp3 et MEF2D), 2 motifs ZII : ZII et ZIIR représentés en vert (éléments de liaison aux ATF, CREB,...), 2 motifs ZIII : ZIIIA et ZIIIB représentés en marron (éléments de liaison à ZEBRA), 2 motifs ZV : ZV et ZV' représentés en orange (éléments de liaison aux ZEB) et 4 motifs SBE représentés en jaune (éléments de liaison aux Smads).

IV. 2. 2. 2) Facteurs contribuant à la réactivation de l'EBV dans les cellules épithéliales

La compréhension des mécanismes induisant le cycle lytique de l'EBV dans les cellules épithéliales rendue difficile par le manque de lignées de cellules épithéliales non transformées infectées de façon latente par l'EBV. L'EBV n'infecte pas efficacement les cellules épithéliales indifférenciées normales (Jiang et al., 2012). Des études réalisées sur des tissus obtenus à partir de patients atteints de leucoplasie orale chevelue (lésions de l'épithélium latéral de la langue infectées par l'EBV) ont suggéré que l'infection par l'EBV de cellules épithéliales se produit normalement dans les couches cellulaires les plus différenciées, entraînant l'infection lytique (Lau et al., 1993).

Il a été montré que les cellules NOK (EBV-infected telomerase-immortalized normal oral keratinocytes) peuvent être infectées de manière latente à long terme par l'EBV de la lignée cellulaire Akata (Wille et al., 2013) et que les protéines lytiques de l'EBV sont exprimés dans les couches de cellules les plus différenciées, tandis que les couches basales indifférenciées restent infectées de manière latente (Kenney and Mertz, 2014). Par ailleurs, les cellules de carcinome squameux fortement infectées par l'EBV, qui peuvent être partiellement différenciées en réponse à la méthylcellulose, expriment également des protéines lytiques en même temps que les marqueurs de différenciation cellulaire. Cette expression de protéines

lytiques peut être induite par des formes activées d'ATF-1 et/ou de la protéine CREB se liant à l'élément de ZII dans Zp (MacCallum et al., 1999) (Karimi et al., 1995). Il est intéressant de noter que la protéine BLIMP-1, requise pour la différenciation terminale des cellules épithéliales et exprimée uniquement dans les couches les plus différenciées de l'épithélium, peut jouer un rôle dans l'activation de la transcription de BZLF1 à partir de Zp durant la différenciation des cellules épithéliales, comme dans les cellules B (Buettner et al., 2012).

L'inhibition de la transcription de Zp joue un rôle essentiel dans l'établissement de la latence virale dans les cellules épithéliales indifférenciées. Cette inhibition est due à un variant épissé de p63 (élément de la famille p53, jouant un rôle clé dans l'inhibition de la réactivation d'EBV), Δ Np63 (Kenney and Mertz, 2014). Ce dernier est caractérisé par l'absence du domaine TAD N-terminale de p63 et est fortement exprimé dans les cellules épithéliales basales indifférenciées, avec une diminution de l'expression au cours de la différenciation. Il est également fortement exprimé dans les NPCs (Crook et al., 2000). L'inhibition de l'expression de Δ Np63 dans les cellules NOK induit l'expression des gènes du cycle lytique de l'EBV, tandis que sa surexpression dans des cellules AGS (carcinome gastrique) infectées par l'EBV supprime l'expression des gènes lytiques (Wille et al., 2013). La cycline D a été montrée comme ayant le même effet que Δ Np63 dans les cellules épithéliales du nasopharynx infectées par l'EBV (Tsang et al., 2012). Les mécanismes moléculaires par lesquels Δ Np63 et la cycline D, identifiés comme suppresseurs de l'expression des gènes très précoces dans les cellules épithéliales infectées par l'EBV d'une façon latente, restent à déterminer.

IV. 2. 2. 3) Facteurs contribuant à la réactivation de l'EBV lors de la différenciation plasmocytaire

La réactivation de l'EBV dans des cellules B à l'état latent est un élément essentiel du cycle de vie du virus. Il a été rapporté que l'infection des cellules B dans un système de modèle de souris humanisées avec un mutant de l'EBV "super-lytique" pour lequel les motifs ZV, ZV', et les éléments ZIIR (motifs inhibiteurs de la transcription) sont tous mutés conduit à un niveau d'expression élevé de la protéine ZEBRA dans la plupart des cellules infectées, mais que peu de cellules expriment des protéines lytiques précoces (normalement induites par ZEBRA), et presque aucune n'expriment des protéines virales tardives (Ma et al., 2012). La réplication lytique peut donc être inhibée dans des cellules B, même en présence d'un niveau d'expression élevé de *BZLF1*. Ceci peut s'expliquer par le fait que les promoteurs des gènes lytiques précoces sont non méthylés, empêchant que BZLF1 puisse induire leur expression (Kenney and Mertz, 2014). Une autre explication est l'association étroite entre l'état de

différenciation des cellules et la capacité de l'EBV à passer d'une forme d'infection latente à une infection de type lytique. Deux facteurs spécifiques des cellules B, PAX5 et Oct-2, permettent de maintenir la latence virale en interagissant directement avec la protéine ZEBRA et en inhibant sa capacité à se lier aux ZREs situés dans les promoteurs des gènes lytiques précoces de l'EBV (Robinson et al., 2012) (Raver et al., 2013). De manière intéressante, la stimulation du BCR et la différenciation plasmocytaire conduisent à la perte de l'expression de ces facteurs. Par ailleurs, la réactivation de l'EBV dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes est négativement corrélée à l'expression d'EBF1, un autre facteur cellulaire également perdu lors de la différenciation des cellules plasmatiques (Davies et al., 2010). Ainsi, la réactivation de l'EBV a probablement lieu en partie suite au recrutement de facteurs qui contribuent à la transcription de *BZLF1* après la perte de facteurs tels qu'Oct-2, PAX5 et EBF1. Il a été montré qu'en absence d'expression de *BRLF1*, Ikaros (un autre facteur de transcription cellulaire présent de manière abondante dans les lymphocytes B), contribue au maintien de la latence de l'EBV, en partie par augmentation de l'expression d'Oct-2. Par contre, une fois que Rta est exprimé, Ikaros favorise l'expression de gènes lytiques de l'EBV et s'associe directement avec Rta. L'activité transcriptionnelle de ZEBRA est également en partie supprimée par la SUMOylation de sa lysine 12 (Hagemeier et al., 2010). Une phosphorylation insuffisante de la sérine 173 de ZEBRA, qui est nécessaire à la réplication lytique induite par ZEBRA et à l'expression des gènes tardifs, peut aussi être une limitation à une infection lytique complète dans certaines conditions (El-Guindy et al., 2007).

Chez l'homme, la réactivation de l'EBV est probablement déclenchée en grande partie par une stimulation du BCR et la différenciation des cellules plasmatiques (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005) (Davies et al., 2010). Deux protéines cellulaires jouant un rôle critique au cours de la différenciation des cellules B en cellules plasmatiques sont les X-box binding protein-1 (XBP-1) et les B lymphocyte-induced maturation protéine-1 (BLIMP-1; aka PRDM1). XBP-1 est un membre de la famille des protéines CREB/ATF. Son variant épissé, XBP-1s, est synthétisé au cours de la différenciation des cellules plasmatiques et au cours du stress du reticulum endoplasmique. XBP-1s se lie directement aux motifs ZII de Zp et active la transcription de Zp (Sun and Thorley-Lawson, 2007) ; il peut aussi activer la transcription du promoteur de *BRLF1* (Rp). L'expression de XBP-1 est suffisante pour réactiver l'EBV dans certaines lignées de cellules infectées par l'EBV de façon latente. D'autres part, BLIMP-1, une protéine de liaison à l'ADN en doigt de zinc, qui fonctionne normalement comme un répresseur, induit une réactivation dans certaines lignées cellulaires infectées par l'EBV et

active la transcription à la fois de Zp et de Rp (Vrzalikova et al., 2011) (Buettner et al., 2012). Les mécanismes par lesquels BLIMP-1 et XBP-1 induisent la transcription de *BZLF1* ne sont pas encore connus. En affectant l'expression des deux gènes lytiques très précoces, ces 2 protéines XBP-1s et BLIMP-1 amplifient leurs effets inducteurs du cycle lytique et peuvent probablement réactiver l'EBV dans un certain nombre de cellules de type spécifique (**Figure 18**).

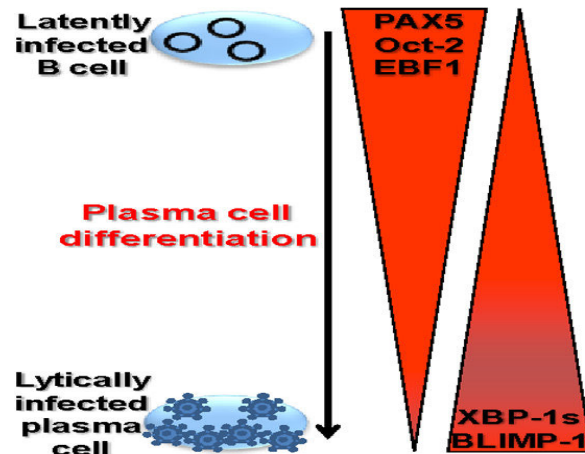


Figure 18 : Induction de la réactivation d'EBV lors de la différenciation plasmocytaire. La réactivation de l'EBV dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes est négativement corrélée avec l'expression de Pax5, Oct-2 et EBF1 dans les cellules B indifférenciées. Par contre, elle est positivement corrélée avec l'expression de XBP-1s et BLIMP-1 chez les plasmocytes. BLIMP-1 : B lymphocyte-induced maturation protéine-1, EBF1 : Early B-Cell Factor 1, OCT2 : octamer-binding protein 2, PAX5 : Paired Box 5 et XBP-1 : X-box binding protein-1 (d'après Kenney and Mertz, 2014).

IV. 2. 2. 4) Facteurs de transcription inhibant la transcription de *BZLF1*

Durant la latence, l'influence des facteurs de transcription suppresseurs de la transcription de *BZLF1* est plus forte que celle l'induisant. La perte de facteurs de répression ou l'activation de facteurs de transcription inducteurs de la transcription de *BZLF1*, suite à des modifications post-traductionnelles de certains éléments de signalisation, conduit à la réactivation.

L'inhibition de la transcription de *BZLF1* par plusieurs facteurs cellulaires (dont MEF-2D : myocyte enhancer factor 2D, YY1 : ying yang 1, E2-2 et les ZEBs : Zinc E-box Binding factor) joue un rôle essentiel dans la création et le maintien de la latence virale dans les cellules B. Les sites de liaison de ces facteurs sur Zp sont présentés dans la **Figure 19**.

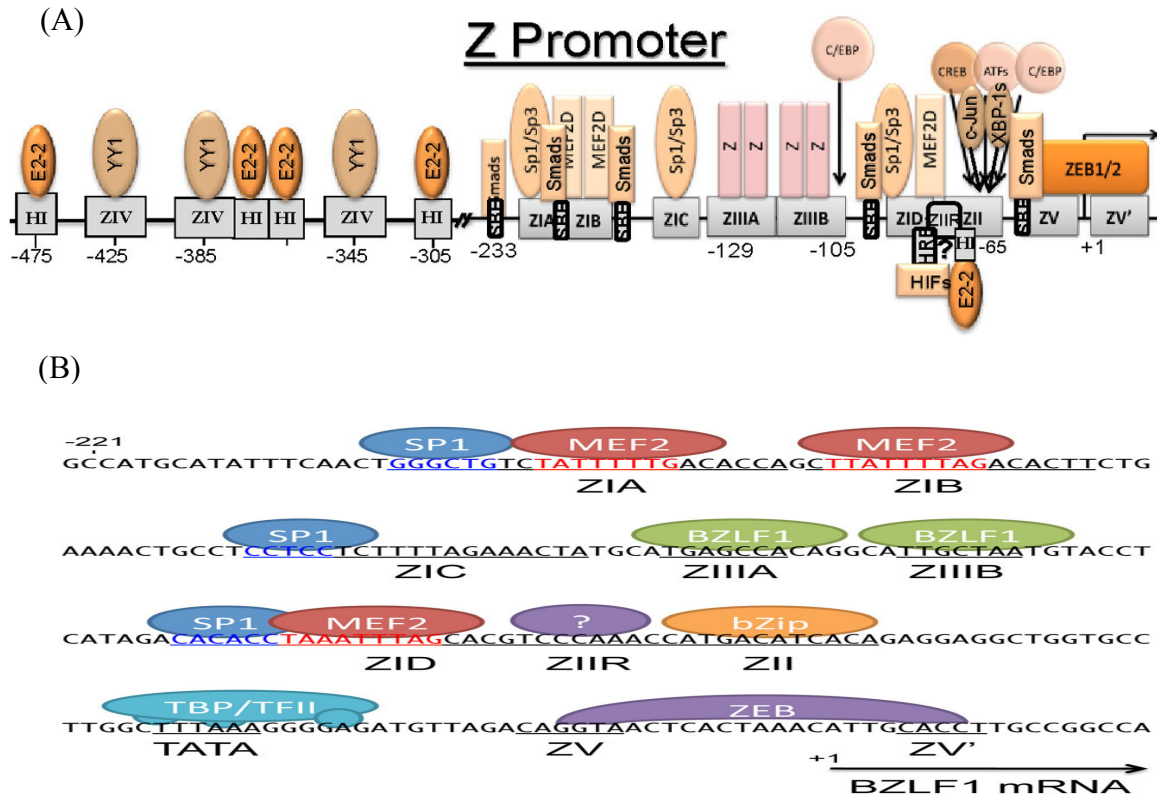


Figure 19 : Représentation schématique du promoteur Zp de *BZLF1* et des facteurs cellulaires modulant l'expression de ZEBRA. (A) Représentation schématique du promoteur du gène *BZLF1* et des facteurs cellulaires responsables de l'activation (dont MEF2D, BZLF1, SP1 et CREB) ou de l'inhibition (dont MEF2D, YY1, E2-2 et les ZEBs) de l'expression de ZEBRA (Kenney and Mertz, 2014a). (B) Représentation schématique de la région Zp minimale du promoteur (-221 à +12) avec les différents facteurs cellulaires qu'y fixent (Murata, 2014).

MEF-2D lie les éléments ZIA, ZIB et ZID de Zp. Pendant la latence, il réprime l'expression du gène *BZLF1* en attirant les HDACs (histones désacétylases) de type II au niveau de Zp (Manet et al., 2003). Suite à l'induction du cycle productif de l'EBV, ces motifs ZI peuvent également fonctionner comme inducteurs de la transcription de *BZLF1* lorsque les MEF2D ne sont plus associés aux HDAC II. Les facteurs MEF2 et leur rôle spécifique dans la réactivation de l'EBV seront abordés dans la partie portant sur les inhibiteurs de HDAC.

La famille des facteurs suppresseurs de la transcription de *BZLF1*, dite ZEB (ZEB1 et ZEB2) a été largement étudiée par le groupe de Mertz (Kraus et al., 2003). Ces facteurs se fixent sur les motifs ZV et ZV' de Zp. En effet, le remplacement de deux nucléotides dans le motif de liaison ZV du génome viral augmente de façon importante la production spontanée de *BZLF1* et de ce fait celle d'autres gènes viraux lytiques (Yu et al., 2007b). Ces ZEBs lient de manière

synergique les deux régions en doigt de zinc présents dans la boîte de liaison E de ZEB1 et ZEB2 (Kraus et al., 2003) (Yu et al., 2007b) (Ellis et al., 2010) (Yu et al., 2012). L'expression de ZEB dépend en grande partie du type cellulaire. Elle est fortement régulée négativement par les membres de 200 familles cellulaires de microARN (miARNs ou miRs) *via* une double boucle de rétroaction négative. Ainsi, les lignées cellulaires EBV-positives pour lesquelles il est très difficile d'induire la réactivation possèdent généralement des niveaux élevés de ZEB1 et/ou ZEB2 et très peu de miARNs 200b et 429. L'inverse est également vrai pour les lignées cellulaires (telle que AGS), pour lesquelles le cycle lytique est facilement induit (Feng et al., 2007) (Ellis-Connell et al., 2010) (Lin et al., 2010). Comme attendu, l'addition de ces miARNs dans les cellules infectées de manière latente induit une réactivation lytique (Ellis-Connell et al., 2010) (Lin et al., 2010). D'autres miARNs cellulaires codés par l'EBV contribuent également à l'entretien de la latence de l'EBV (Lin and Flemington, 2011) (Forte and Luftig, 2011) (Zhu et al., 2013) (Skalsky et al., 2012) (Riley et al., 2012). Par ailleurs, ZEB1 et ZEB2 sont deux protéines interagissant également avec Smad (SIPs : Smad-interacting proteins) et ZEB1 peut être aussi un composant des complexes activateurs dans certaines lignées cellulaires (Postigo et al., 2003). Ainsi, de même que MEF2D, ils peuvent passer de répresseur de la transcription de Zp à activateur dans certaines conditions, comme en présence de TGF- β 1. ZEB2 joue un rôle plus important dans la répression de Zp lorsque ZEB1 et ZEB2 sont présents. Cependant, la présence de ZEB1 suffit à elle seule pour jouer le rôle de suppresseur lorsqu'il y a une faible quantité de ZEB2 (Ellis et al., 2010).

Des études antérieures ont montré que l'activité de Zp est limitée par le facteur de répression ying yang 1 (YY1) qui est un facteur en doigt de zinc toujours présent (Montalvo et al., 1995), l'immunoglobuline de liaison par sa région Smu (SMUBP-2 / IGHMBP2) et la protéine de liaison à boîte E (E2-2) (Thomas et al., 2003). Les facteurs suppresseurs de Zp YY1 et la boîte E de la protéine de liaison E2-2 se lient respectivement aux motifs ZIV et HI de Zp. Toutefois, les facteurs qui se lient aux motifs ZIIR sont encore à déterminer (Thomas et al., 2003) (Yu et al., 2011). ZIIR, identifié par Liu et al. et adjacent à ZII, peut fortement contribuer à l'inhibition de la transcription de Zp. Des mutations dans les deux motifs de liaison ZV et ZIIR du génome de l'EBV induisent de hauts niveaux d'expression des gènes lytiques *in vivo* et *in vitro* et inhibent la transformation des cellules B primaires du sang *in vitro* (Ma et al., 2012) (Yu et al., 2012). Néanmoins, ce mutant super-lytique induit des lymphomes B chez les souris à système immunitaire humanisé, dans la mesure où il est impossible de parvenir à une infection lytique complète dans ce modèle animal (Liu et al.,

1998) (Ma et al., 2012). Les sites SP1/NF1 situés à environ 360 pb en amont du site de début de transcription de ZEBRA sont de plus également impliqués dans la suppression de *BZLF1* (Niller et al., 2002).

La protéine ubiquitaire JUNDM2 (Jun dimerization protein 2), connue pour se dimériser avec c-Jun afin de reprimer l'activation induite par AP1, est aussi classée comme un puissant suppresseur cellulaire de la transcription de *BZLF1*. Elle est de type b-Zip et se lie de manière compétitive avec les facteurs activateurs de la transcription AP1 et CREB aux motifs ZII de Zp, et conduit à une diminution de la transcription de *BZLF1*. La mutation ponctuelle du motif ZII inhibe bien l'expression de *BZLF1* mais ce motif peut être associé soit à l'induction de la transcription de *BZLF1* soit à son inhibition, en fonction des facteurs avec lesquels il se lie (Murata et al., 2011).

Les mécanismes moléculaires associés à l'inhibition de la transcription de *BZLF1* ne sont pas encore clairs. L'oxyde nitrique a longtemps été considéré comme un régulateur de la réactivation de l'EBV. Cependant, en 1994, Mannick et al. ont montré que cette molécule inhibe l'expression de *BZLF1* (Mannick et al., 1994). Ceci a été confirmé par la suite, par les travaux du groupe de Sairenji (Gao et al., 1999).

En plus des répresseurs, des corépresseurs de *BZLF1* peuvent diminuer l'activité de Zp. En effet, la sumoylation de BZLF1 par de petites molécules modificatrices analogues à l'ubiquitine peut conduire au recrutement d'un complexe de répression incluant des HDAC au promoteur de *BZLF1* et supprimer sa transcription (Murata et al., 2010). Kenney et ses collègues ont largement étudié les partenaires interagissant avec la protéine BZLF1 et causant une répression de sa transcription. Des interactions de type inhibiteur ont été mises en évidence avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur X de rétinoïdes (RXR) (Sista et al., 1993) (Sista et al., 1995), la sous-unité p65 de NF- κ B (Gutsch et al., 1994), Oct-2 (octamer-binding protein 2) (Robinson et al., 2012), ou PAX5 (paired box protein-5) (Raver et al., 2013).

Les voies de signalisation impliquées dans la suppression de la réactivation de l'EBV comprennent les voies NF- κ B et JAK/STAT, même si les mécanismes moléculaires impliqués restent encore à clarifier. Brown et al. ont montré les premiers en 2003 que NF- κ B joue un rôle dans l'inhibition de la réplication lytique des gamma-herpèsvirus, y compris l'EBV (Brown et al., 2003). Ce travail a été confirmé par d'autres groupes (Liu et al., 2008) (Li et al., 2012) (Saito et al., 2013). La voie JAK-STAT régule également négativement le cycle lytique

de l'EBV (Konforte and Paige, 2009) (Daigle et al., 2010). Il est particulièrement intéressant de noter que les voies NF- κ B et JAK-STAT induisent par ailleurs l'expression de gènes latents, tels que LMP1 (Chen et al., 2001) (Chen et al., 2003) (Kis et al., 2006) (Johansson et al., 2009) (Kis et al., 2010) et que LMP1 lui-même peut activer ces voies (Gires et al., 1999) (Huen et al., 1995) (Paine et al., 1995) (Eliopoulos and Young, 2001) (Tsao et al., 2002). L'existence de cette boucle rétroactive positive entre NF- κ B, JAK-STAT, et LMP1 pendant la latence implique que ces facteurs servent de régulateurs essentiels pour le maintien de la latence de l'EBV. Cette boucle de régulation semble également jouer un rôle dans la suppression de la réactivation du virus. LMP1 favorise la latence par inhibition de l'induction du cycle lytique, du moins en partie grâce à l'activité de NF- κ B (Prince et al., 2003). La perturbation de cette boucle rétroactive à l'aide de réactifs chimiques, tel qu'un inhibiteur de HSP90, peut être employé comme un moyen de traitement des cancers associés à l'EBV (Murata et al., 2013a). Le rôle de la boucle rétroactive faisant intervenir NF- κ B, JAK-STAT et LMP1 dans le renforcement de la latence est admise, mais l'implication directe des deux voies NF- κ B et JAK-STAT comme supprimeur de la réactivation de l'EBV reste encore controversée (Gao et al., 2001) (Goswami et al., 2012) (Nanbo et al., 2012).

IV. 2. 2. 5) Facteurs de transcription induisant la transcription de *BZLF1*

L'expression de *BZLF1* est généralement activée dans les cellules B par le recrutement de facteurs de transcription inducteurs. Ces facteurs sont recrutés par les motifs ZI, ZII et ZIII de la région minimal de Zp. Il peut s'agir de facteurs cellulaires tels que MEF2, SP1, du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) (complexe CREB/ATF) ou de la protéine BZLF1 elle-même (**Figure 19 A et B**). Cette expression de *BZLF1* et le recrutement des facteurs inducteurs de la transcription du gène très précoce de la réactivation *BZLF1*, sont fonction des stimuli physiologiques et des agents chimiques employés.

Typiquement, ZI possède trois motifs riches en A/T ciblés par MEF2 et un motif riche en G/C ainsi que des motifs CACC et CTCC ciblés par le facteur de transcription SP1 ou des molécules apparentées tels que d'autres membres de la famille SP ou KLF (Liu et al., 1997a) (Liu et al., 1997b). Les motifs riches en C/G et les boîtes CACC se trouvent spécifiquement dans ZI A, C, et D.

On peut souligner le cas particulier de MEF2D, qui se lie à l'élément ZI et peut passer de facteur répresseur à facteur inducteur de la transcription de *BZLF1* et de la réactivation de l'EBV, suite à sa déphosphorylation lors de l'engagement du BCR (Bryant and Farrell, 2002).

SP1/KLF est une superfamille de facteurs de transcription avec des motifs en doigt de zinc. La sous-famille de SP1 comprend neuf membres apparentés (SP1-9) tandis que la sous-famille KLF en comprend 17 (KLF1-17). Le niveau d'expression de ces facteurs peut varier en fonction du type cellulaire, mais ils sont généralement ubiquitaire. Liu *et al.* (1997) ont mis en évidence la liaison de SP1 et SP3 aux promoteurs ZI A, C et D (Liu et al., 1997b). Parmi les sites de liaison à SP1, Tsai *et al.* (2011) ont montré que le motif ZID est le plus important pour la liaison à SP1 et que sa mutation provoque une perte significative de la transcription de *BZLF1* induite par des réactifs chimiques (Tsai et al., 2011). Récemment, KLF4 a été identifié comme un transactivateur de l'expression de *BZLF1*. L'introduction de mutations ponctuelles dans les sites de liaison à SP1/KLF donc dans ZIA, C et D de Zp révèle que cela n'abolit pas l'expression de *BZLF1* mais que ces sites sont nécessaires pour que l'activation du promoteur en réponse aux inducteurs chimiques soit complète (Murata et al., 2013b). Les membres de la famille SP1/KLF les plus importants pour l'expression de *BZLF1* *in vivo* sont encore mal identifiés, mais des résultats d'expériences de knockdown suggèrent que SP1 serait le facteur le plus limitant (Tsai et al., 2011).

Concernant le motif ZII, il est situé à proximité de la boîte TATA de la région Zp (Flemington and Speck, 1990a). Il présente des similitudes avec le motif consensus de liaison à AP-1 et se lie à c-jun et c-fos. ZII présente des similitudes avec CRE (CREB-responsive element). Il est ciblé par divers facteurs de transcription cellulaires de type b-Zip qui sont, en plus d'AP-1, d'autres facteurs de transcription activant la transcription de *BZLF1* tels que CREB (Ruf and Rawlins, 1995), ATF-1 (Wang et al., 1997), l'hétérodimère ATF-2/c-Jun, le CCATT-activateur de protéines (Wu et al., 2004) et une forme épissée de XBP-1 (Bhende et al., 2007) (Sun and Thorley-Lawson, 2007) (Sun and Thorley-Lawson, 2007) (McDonald et al., 2010) (Shirley et al., 2011). La plupart de ces facteurs de transcription sont activés par phosphorylation. Il est intéressant de noter qu'une variété de facteurs cellulaires, mais pas *BZLF1*, peut se lier à une séquence ZII. L'introduction d'une mutation au niveau de ZII provoque une inhibition de l'expression abortive de *BZLF1* et limite également l'induction de *BZLF1* par les réactifs chimiques inducteurs (Murata et al., 2013b).

Smad, qui est une molécule activée en aval de la signalisation de TGF- β , se lie à au moins cinq motifs qui peuvent intervenir de manière additive sur le promoteur de *BZLF1*. Ces motifs sont nommés SBE (Smads-responsive elements) (Iempridee et al., 2011).

Une fois exprimée, la protéine BZLF1 peut cibler et activer son propre promoteur au niveau du motif ZIII de Zp. Il existe deux boîtes ZIII situées l'une à côté de l'autre dans Zp : ZIIIA et ZIIIB. ZIIIB semble avoir une affinité plus grande pour la protéine BZLF1 (Flemington and Speck, 1990b). Cette boucle de rétroaction positive semble être nécessaire pour l'activation complète des promoteurs de *BZLF1* (Yin et al., 2004). BZLF1 peut de plus interagir avec d'autres activateurs tels que les protéines de liaison CREB (Adamson and Kenney, 1999) (Zerby et al., 1999), Ku80 (Chen et al., 2011) et le transducteur de la régulation de CREB (Murata et al., 2009), ce qui conduit à l'amplification de l'activation des promoteurs dépendante de *BZLF1*.

Il est intéressant de noter que la plupart des stimuli inducteurs du cycle lytique, y compris les iHDAC, le font par activation des kinases cellulaires, dont JNK, P38/MAPK, ERK, PKC, PKD et/ou PI3/AKT qui sont induites à la fois, suite à l'endommagement de l'ADN et par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérés par ces stimuli. Inversement, les inhibiteurs de ces kinases réduisent l'efficacité de plusieurs stimuli induisant le cycle lytique (Iempridee et al., 2011) (Darr et al., 2001) (Adamson et al., 2000) (Goswami et al., 2012) (Liang et al., 2002). L'activation de NF- κ B est également nécessaire pour l'induction du cycle lytique, par l'intermédiaire du TGF- β ou suite à l'engagement du BCR. Il semble que ce soit *via* les MAPK (Goswami et al., 2012) (Oussaief et al., 2011).

IV. 2. 3) Régulation de l'expression de gène très précoce *BRLF1*

Le promoteur R (pR) de *BRLF1* comporte trois éléments de liaison à BZLF1 (ZRE 2 et 3) ainsi que d'autres éléments permettant la fixation de facteurs activateurs ou inhibiteurs de la transcription de BRLF1 (**Figure 20**) (Li et al., 2012a).

La transcription de Rta est activable par la protéine BZLF1 ainsi que par les facteurs de transcription sp1/sp3. Par ailleurs, il a été montré que l'activation du pR par la molécule réactivatrice du cycle lytique TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) passerait par un site de fixation pour le facteur cellulaire Zif268 (Zalani et al., 1995).

Il a également été proposé que la protéine Rta autoactive sa propre expression (Sinclair et al., 1991), cependant aucun site de fixation pour la protéine Rta n'a été caractérisée sur le

promoteur pR et l'activation de la transcription induite par Rta à partir de ce promoteur est très faible, comparée à celle observée à partir de promoteurs portant des sites de fixation pour la protéine R (comme ceux des gènes précoces). Il a été suggéré que l'autoactivation du promoteur pR par la protéine Rta passe par des éléments de réponses capables d'interagir avec les facteurs cellulaires sp1 et sp3 (Ragoczy and Miller, 2001).

D'autres facteurs jouent un rôle inhibiteurs de l'expression de Rta en se fixant sur le promoteur pR : ZEB et YY1. L'inhibition de la fixation du facteur YY1 sur le promoteur pR entraîne une augmentation du niveau d'expression d'un gène rapporteur mis sous le contrôle de ce promoteur. Le recrutement de ce facteur represseur sur le promoteur pR pourrait expliquer le fait que le gène *BRLF1* n'est pas exprimé dans les cellules infectés par l'EBV durant la phase de latence virale (Zalani et al., 1997).

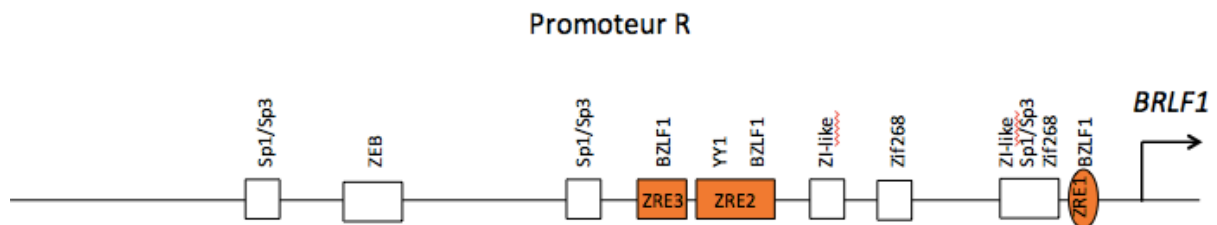


Figure 20 : Représentation schématique du promoteur R de *BRLF1*. La séquence comporte 3 éléments de fixation à BZLF1 (ZRE1, 2 et 3) qui est un activateur de la transcription, ainsi que des éléments de liaison à d'autres facteurs activateurs (Sp1, Sp3 et Zif268) ou inhibiteurs (ZEB (Z element binding) et YY1) de la transcription.

IV. 2. 4) Gènes et protéines précoces, amplification du génome viral

Les protéines précoces, également appelées Early Antigen EA sont induites par les transactivateurs ZEBRA et Rta. Bien que leurs gènes soient transcrits avant la réplication lytique du génome viral, cette transcription peut être arrêtée par la présence d'inhibiteurs de synthèse protéique. Les protéines précoces ont été divisées depuis longtemps en deux catégories par imagerie d'immunofluorescence : les EA-R (restricted) présentes dans le cytoplasme, et les EA-D (diffuse) retrouvées dans le noyau et dans le cytoplasme. La plupart de ces protéines ont été caractérisées comme impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans la régulation de l'expression des protéines tardives même si d'autres protéines ont également été décrites.

Parmi les protéines précoces de l'EBV formant le complexe de réplication, on distingue

l'ADN polymérase BALF5 et son facteur de processivité BMRF1, la protéine de liaison à l'ADN BALF2, le complexe hélicase- primase BBLF4–BSLF1 et la sous unité accessoire BBLF2/3, l'uracyl ADN glycosylase (BKRF3) ou encore l'exonucléase BGLF5. On trouve également des protéines associées au complexe de réplication importantes pour le métabolisme des acides nucléiques, comme la déoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (dUTPase) BLLF3, la thymidine kinase BXLF1 ou la ribonucléotide réductase BaRF1. Deux protéines précoces de l'EBV jouent de plus le rôle de facteurs de transcription, Il s'agit du produit des gènes *BMRF1* et *BRRF1* (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Gènes précoces du cycle lytique de l'EBV selon la classification EA-D/EA-R et fonction des protéines qu'ils codent. EA-D : Early Antigen diffuse, EA-R : Early Antigen restricted.

Gènes précoces du cycle lytique	Type de protéine	Protéines précoces	Fonction ou caractère de la protéine
<i>BSMLF1 (SM)</i> et <i>BMRF1</i>	EA-D	EB2 (SM, BMLF1, Mta) et BMRF1	Transactivation de l'expression d'autres gènes précoces de l'EBV
<i>BXLF1</i>		BXLF1	Thymidine kinase
<i>BALF2</i>		BALF2	Protéine majeure de liaison à l'ADN
<i>BGLF5</i>		BGLF5	Exonucléase
<i>BALF5</i>		BALF5	ADN polymérase ADN-dépendante
<i>BHRF1 EA-R nuclear antigen</i>	EA-R	BHRF1	Composant du complexe antigène précoce
<i>BORF2 et BaRF1</i>		BORF2 et BaRF1	Ribonucléotide réductase
<i>BKRF3</i>		BKRF3	Uracile ADN-glycosylase
<i>BGLF4</i>		BGLF4	Protéine kinase Sérine/thréonine
<i>BRRF1</i>		BRRF1	facteur de transcription activent le promoteur IE EBV Zp par ses effets sur c-Jun
<i>BKRF4</i>		BKRF4	Protéine du tégument

La protéine précoce M ou EB2 est codée par *BSMLF1*. Elle est très abondante dans le noyau et à la capacité de se lier aux ARNm non épissés des certains gènes des protéines précoces et

tardives. La plupart des gènes lytiques de l'EBV sont dépourvues d'introns et les ARNm non épissés sont souvent instables. EB2 permet d'améliorer leur stabilité (Gruffat et al., 2002) et contribue à leur transport du noyau vers le cytoplasme ainsi qu'à favoriser leur traduction (Semmes et al., 1998) (Ricci et al., 2009). EB2 inhibe également l'activation de la PKR capable d'entraîner une forte inhibition de la synthèse protéique lors d'infections virales, permettant au virus d'échapper à cette régulation (Poppers et al., 2003).

Une protéine codée par *BHRF1* et localisée dans le noyau et dans le cytoplasme a été décrite. Elle possède des homologies avec la protéine bcl2 cellulaire, en particulier son effet protecteur contre l'apoptose. Elle favorise ainsi la réplication virale en prévenant la mort de la cellule hôte. Elle protège les cellules B et les cellules épithéliales de l'apoptose, ce qui laisse penser qu'elle joue un rôle dans la genèse tumorale (Dawson et al., 1998) (Huang et al., 1998). Un autre homologue de Bcl2 a également été décrit comme étant codée par *BALF1* (Marshall et al., 1999).

BARF1 code pour un récepteur soluble du colony stimulating factor 1 (CSF1). Cette protéine protège le virus des monocytes et des macrophages en les empêchant de sécréter de l'interféron (Cohen and Lekstrom, 1999), ainsi qu'en bloquant leur prolifération induite par les cytokines (Strockbine et al., 1998).

La réplication lytique de l'EBV a lieu, à partir des origines de réplication OriLyt, grâce à l'ADN polymérase virale. Les souches d'EBV contiennent 2 oriLyt à l'exception de la souche B95-8 qui semble pourtant se répliquer de façon identique. De même que des sites de liaison pour ZEBRA et Rta, OriLyt comprend les promoteurs de *BHRF1* et de *BHLF1* (Hammerschmidt and Sugden, 1988) (Hammerschmidt and Sugden, 2013). Les deux domaines oriLyt sont essentiels à la réplication. Le domaine dit « amont » contient deux éléments de réponse à ZEBRA, la liaison de cette protéine étant indispensable pour assurer une réplication complète. Le domaine dit « aval » peut former une structure d'ADN en triple hélice, qui pourrait être importante pour la réplication virale. La réplication lytique implique la formation de concatémères « tête-à-queue » et a vraisemblablement lieu selon un mode de cercle roulant. Après la réplication, l'ADN viral est coupé au niveau des régions terminales répétées (TR), aboutissant ainsi à des génomes linéaire de taille complète prêts à être encapsidés (Schepers et al., 1996) (**Figure 21**).

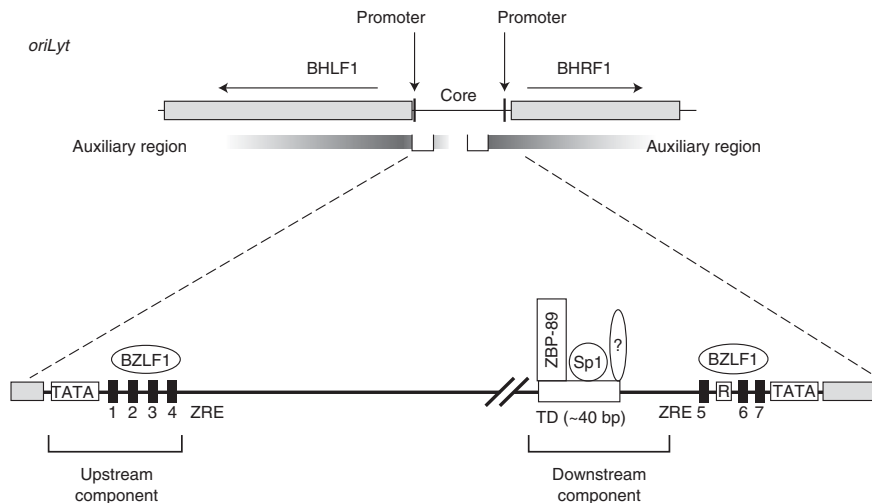


Figure 21 : Représentation schématique de l'origine de réplication OriLyt. OriLyt couvre environ 7700 pb de la souche B95-8 de l'EBV dont les gènes *BHLF1* et *BHRF1* et leurs promoteurs. Les séquences de ces gènes contribuent à la fonction d'OriLyt mais ne sont pas essentiels. Le domaine essentiel ou « core » d'OriLyt comprend : les promoteurs et les régions intergéniques de ces gènes, les deux éléments essentiels (amont et aval) de fixation de BZLF1 aux domaines *BZLF1*-sensibles (ZRE) et les facteurs cellulaires ZBP-89, SP1, ainsi que d'autres protéines inconnues nécessaires pour la fonction d'OriLyt. BZLF1 se lie également au promoteur du gène *BHRF1* permettant d'améliorer l'activité d'OriLyt. Ce domaine (sites ZRE 5, 6 et 7) peut être remplacé par un activateur hétérologue pour potentialiser la fonction d'OriLyt. L'élément encadré marqué R se lie au transactivateur viral *BRLF1* et ne contribue pas directement à la réplication lytique de l'ADN de l'EBV (d'après Hammerschmidt and Sugden, 2013).

IV. 2. 5) Gènes et protéines tardives, production des particules virales

Les protéines tardives sont exprimées après la réplication du génome et l'expression des gènes les codant est fortement diminuée en présence d'inhibiteurs de la réplication virale ciblant l'ADN polymérase. Leurs promoteurs ne comprennent pas d'élément de réponse à ZEBRA ou à Rta. Les protéines exprimées lors de la phase tardive sont des protéines de structure comprenant des antigènes de capsid (viral capsid antigen : VCA) et des antigènes de membrane (membrane antigen : MA) (Dillner and Kallin, 1988). La capsid est composée essentiellement par une protéine dite « protéine majeure de la capsid » (codée par le cadre de lecture *BcLF1*), mais également par d'autres protéines : la protéine triplex 1 (BORF1), la protéine triplex 2 (BDLF1), la petite protéine de capsid (BFRF3), la protéine interne de la charpente ou assemblin (BdRF1) et la protéase (BVRF2). Les glycoprotéines de l'enveloppe

virale sont les : gp350/220 (codées par les cadres de lectures *BLLF1*), gp110 (codées par *BALF4*), gp85 (codées par *BXLF2*), gp55/80 (codées par *BILF2*) et gp42 (codée par *BZLF2*). Le gène *BcRF1* code de plus pour une protéine virale vIL-10 tardive, homologue à l'interleukine 10 cellulaire et jouant un rôle important pour la protection du virus vis à vis de la réponse immunitaire (Hudson et al., 1985) (Salek-Ardakani et al., 2002). La protéase tardive BvRF2 est également nécessaire à l'assemblage et à la maturation des particules virales (Henson et al., 2009).

Les protéines tardives sont nécessaires à la mise en place de la capside et de l'enveloppe virale (en particulier des glycoprotéines de surface), ce qui permet d'obtenir un virion complet qui peut être libéré de la cellule (**Tableau 4**).

Tableau 4 : principaux gènes et protéines tardives du cycle lytique de l'EBV et leurs fonctions.

gènes tardives du cycle lytique	Protéines tardives	Fonction ou caractère de la protéine
<i>BcLF1</i>	VCA	Protéine majeure de la capside
<i>BORF1</i>	BORF1/VP19C	Protéine mineure de la capside
<i>BDLF1</i>	BDLF1	Protéine mineure de la capside
<i>BFRF3</i>	BFRF3/VP26	Petite protéine de la capside
<i>BdRF1</i>	BdRF1	Protéine d'échaffaudage ou assemblage (scaffold protein)
<i>BLLF1</i>	gp350/220	Glycoprotéine d'attachement virale
<i>BALF4</i>	gp110	Glycoprotéine d'enveloppe
<i>BXLF2</i>	gp 85	Glycoprotéine d'enveloppe entrant dans la formation du complexe gp85-gp25-gp42 qui se lie aux molécules du CMH II des lymphocytes B
<i>BILF2</i>	gp78	Glycoprotéine susceptible de jouer un rôle dans la réplication virale
<i>BZLF2</i>	gp42	Glycoprotéine d'enveloppe entrant dans la formation du complexe gp85-gp25-gp42 qui se lie aux molécules du CMH II des lymphocytes B. Responsable de la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale
<i>BcRF1</i>	v-IL10	homologue à l'interleukine 10 cellulaire jouant un rôle important pour la protection du virus vis à vis de la réponse immunitaire
<i>BvRF2</i>	BvRF2	Assemblage et maturation virale
<i>BNRF1</i>	BNRF1	Protéine du tégment
<i>BXRF1</i>	BXRF1/UL24	Protéine de fusion
<i>BKRF2</i>	gp25	Glycoprotéine entrant dans la formation de complexe gp85-gp25-gp42 qui se lie aux molécules du CMH II des lymphocytes B
<i>BDLF3</i>	gp150	Glycoprotéine susceptible de jouer un rôle dans la réplication viral
<i>BBRF3</i>	gM	Glycoprotéine susceptible de jouer un rôle dans la réplication viral
<i>BLRF1</i>	gN	Glycoprotéine susceptible de jouer un rôle dans la réplication viral

Partie 2 : Le vorinostat : un inhibiteur des HDAC, inducteur de l'apoptose et de la réactivation de l'EBV

I. Les Histones déacétylases (HDAC)

I. 1) Chromatine et HDAC

Au sein d'un organisme donné, les cellules contiennent une information génétique identique mais le profil d'expression génique est propre à chaque type cellulaire. Seul un nombre limité de gènes est exprimé au sein d'un même type cellulaire parmi les quelques 20000 gènes du génome humain, avec un niveau d'expression différent d'un type cellulaire à un autre, ceci notamment en fonction de la spécificité cellulaire ou de l'influence environnementale. Cette différence d'expression est basée sur la régulation spatio-temporelle de la transcription des gènes, qui implique de nombreuses interactions entre la chromatine, la machinerie basale de transcription et les facteurs de transcription (Pennisi, 2007).

Les modifications d'expression de gènes (liées souvent à des mutations, des délétions ou des amplifications géniques) sont des signatures caractéristiques des cellules tumorales. Récemment, ces variations d'expression des gènes ont été associées à des défauts d'acétylation des histones (protéines clés du nucléosome). Il s'agit d'une des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes de la cancérogenèse.

I. 1. 1) Organisation chromatinienne

Environ deux mètres d'ADN sont compactés dans le noyau de quelques microns de diamètre dans chaque cellule, organisés grâce à l'intervention de protéines histoniques en une structure compacte appelée « chromatine ».

L'accessibilité du promoteur aux facteurs de transcription dépend de la structure et du positionnement des unités fondamentales de la chromatine appelées « nucléosomes ». Ces derniers sont répétés et organisés sous forme d'un nucléo-filament qui peut adopter des niveaux de structuration plus compacts et plus complexes. Les nucléosomes sont constitués (1) d'une unité centrale très conservée parmi les espèces et formée d'un cylindre d'octamère d'histones composé de quatre paires d'histones – H2A, H2B, H3 et H4 – autour duquel s'enroule 146 pb d'ADN grâce à des interactions électrostatiques et (2) d'une région d'ADN

internucléosomale dont la longueur varie selon l'espèce et le type cellulaire et où s'incorporent les histones internucléosomales H1, également variables en taille (Wu and Grunstein, 2000) (Sivolob and Prunell, 2004).

Les histones sont de petites protéines très riches en acides aminés basiques. Elles possèdent un domaine globulaire carboxy-terminal formant le cœur du nucléosome et une queue amino-terminale exposée à la surface du nucléosome et sujette à diverses modifications post-traductionnelles (Uberbacher and Bunick, 1985). Ces modifications vont influencer l'état de compaction de la chromatine et donc modifier les niveaux d'expression des gènes. Les histones de la particule centrale (H2A/H2B/H3/H4) sont de petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution avec des extrémités N-terminales riches en résidus lysine et arginine plus variables et dépourvues de structures secondaires. Plusieurs modifications post-traductionnelles peuvent affecter leurs charges, l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéines-protéines avec le nucléosome. Les queues N-terminales des histones H3 et H4 font saillie du corps globulaire de l'octamère d'histone et comportent une grande proportion d'acides aminés basiques chargés positivement. Elles passent sur, et entre, les enroulements de la superhélice d'ADN pour interagir avec les nucléosomes voisins (Luger et al., 1997) (Dutnall and Ramakrishnan, 1997) (Iwasaki et al., 2013). Chez les eucaryotes supérieurs, Les histones internucléosomales sont composées de trois domaines : un domaine globulaire central non polaire, essentiel pour les interactions avec l'ADN, et deux extrémités N et C-terminales non structurées, hautement basiques et soumises à des modifications post-traductionnelles. Ces histones internucléosomales jouent un rôle important dans l'espacement des unités nucléosomales et dans la compaction de l'ADN.

Un assemblage en des structures de plus en plus complexes comme des spirales, des solénoïdes ou des hélices se fait finalement grâce aux nucléosomes, pour atteindre le niveau d'organisation maximal appelé « le chromosome » (**Figure 22**). Ceci met également en jeu une famille de protéines non-histones, dont la topo-isomérase II est la plus importante.

Pour initier la transcription, la structure très compacte de chromatine doit être remodelée sous une forme décondensée par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles des histones. Dans le cas contraire, les sites de reconnaissance de la machinerie de transcription ainsi que ceux des facteurs de transcription sont difficilement accessibles.

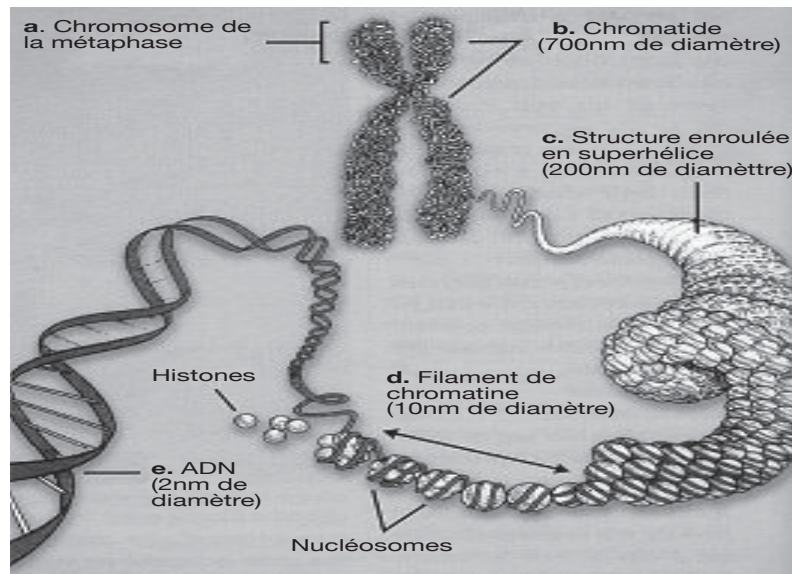


Figure 22 : Organisation de l'information génétique sous forme de chromatine. Au sein du nucléosome (le plus petit niveau d'organisation) deux super-enroulements d'ADN (environ 150 pb) sont liés à un octamère d'histones. Ces nucléosomes sont reliés entre eux grâce à de courtes séquences d'ADN de 10 à 80 pb. Au niveau supérieur d'organisation, les filaments de chromatine sont repliés et super-enroulés pour former des structures plus complexes aboutissant au chromosome (d'après Vandermeers et al., 2008).

I. 1. 2) Code des histones

Il existe deux types de chromatines : l'euchromatine qui peut être transcrite puisqu'elle correspond à la chromatine à l'état relâché et l'hétérochromatine non transcrite correspondant à des régions du génome qui sont condensées et donc inaccessibles aux facteurs de transcription (par exemple les centromères et les télomères) (Felsenfeld and Groudine, 2003). Il est évident depuis quelques années que la chromatine est une entité dynamique au sein de laquelle interviennent des changements fréquents et étroitement régulés de manière spatio-temporelle entre les états transcriptionnellement actifs (euchromatine) et ceux qui sont réprimés (hétérochromatine) (Mellor, 2006) (Clayton et al., 2006).

Les queues N-terminales des histones sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles qualifiées d'épigénétiques (acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitination ou sumoylation). L'acétylation et la méthylation impliquent de petits groupements chimiques, tandis que l'ubiquitination et la sumoylation ajoutent de plus gros fragments et engendrent des changements plus profonds de la chromatine. Ces modifications modulent les interactions des histones avec l'ADN ainsi qu'avec les facteurs spécifiques et généraux de la transcription. Elles agissent de manière séquentielle ou en combinaison pour

former le code des histones. Les conséquences fonctionnelles de ces modifications peuvent être soit directes, causant des changements structuraux de la chromatine, soit indirectes, agissant *via* le recrutement de protéines effectrices (Berger, 2007). L'ensemble des modifications et de leurs conséquences biologiques est appelé « code histone » (Jenuwein and Allis, 2001). Ce code fournit des sites de liaison pour des protéines effectrices qui les interprètent, afin de favoriser ou d'inhiber la transcription des gènes (Strahl and Allis, 2000) (Jenuwein and Allis, 2001) (Fischle et al., 2003).

Les modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles. La lysine est un élément clé parmi les résidus ciblés par les modifications post-traductionnelles des histones. Elle peut subir l'addition de certains résidus par les processus d'acétylation, de méthylation, d'ubiquitination et de sumoylation. La méthylation peut avoir lieu sur plusieurs résidus de la même lysine (mono-, di- ou triméthylation), augmentant encore la diversité des fonctions biologiques (Bannister and Kouzarides, 2005) (Berger, 2007). Certaines modifications des lysines conduisent à des effets fonctionnels relativement clairs. L'acétylation est principalement liée à une activation de la transcription (même si en réalité il s'agit d'un processus plus complexe détaillé ultérieurement) et la sumoylation semble entraîner majoritairement une répression. La méthylation et l'ubiquitination ont des effets variables qui dépendent du résidu et du contexte. La triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 intervient dans l'induction des gènes tandis que la triméthylation de la lysine 9 est observée au sein de l'hétérochromatine qui est transcriptionnellement inerte. De même, deux sites d'ubiquitination différents des histones H2A et H2B sont corrélés respectivement à une transcription active et réprimée. En plus des modifications observées au niveau des lysines, les résidus sérines et thréonines peuvent être phosphorylés alors que les arginines peuvent être mono- ou diméthylés. Ces modifications semblent en général être liées à une transcription active (Berger, 2007).

D'autres molécules conduisent à l'inverse à l'élimination de certains résidus (Bannister and Kouzarides, 2005) (Berger, 2007). Les HDACs (histone désacétylases) enlèvent les groupements acétyle. Les sérine/thréonine phosphatases retirent les groupements phosphate. Les ubiquitine protéases détachent les résidus ubiquitines. Les déiminasés altèrent la méthylation des arginines par conversion des arginines mono-méthylées en citrulline. Les lysines déméthylases qui ont été récemment identifiées et regroupent les enzymes de la classe LSD1 (lysine-specific demethylase 1) sont responsables du retrait des groupements mono-méthylés des résidus lysine. Les enzymes de la classe jumonji enlèvent les groupements di-

ou tri-méthylés des résidus lysine.

I. 2) Modifications post-traductionnelles par acétylation/désacétylation

Le processus d'acétylation/désacétylation des histones est l'un des mieux caractérisés parmi les modifications post-traductionnelles. Il est étroitement contrôlé dans les cellules normales et fait partie intégrante de la régulation de la transcription des gènes. Le niveau d'acétylation des histones est le résultat d'un équilibre dynamique entre les activités opposées de deux types d'enzymes : les histones acétyltransférases (HATs) (acétylation) et les histones désacétylases (HDACs) (désacétylation) (Vogelauer et al., 2000) (Eberharter and Becker, 2002).

I. 2. 1) Acétylation

I. 2. 1. 1) Les HATs

Deux principales familles de HATs sont regroupées selon leurs homologie de séquence : (1) les GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases), incluant les PCAF (facteur associé à CBP/p300) et (2) les MYST (MORF-Ybf2-Sas2-TIP60). Plusieurs autres facteurs liés à la transcription possèdent également une activité HAT, sans pour autant posséder d'homologie entre eux ou avec une des deux familles précitées. Il s'agit d'un groupe nommé « classe orpheline », qui comporte les protéines CBP/p300, TAFII-250 (un TBP-TATA Binding Protein-Associated Factor) et la protéine SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1). Le CBP/p300 est actuellement considéré comme l'une des HATs les plus puissantes et versatiles. Toutes les protéines de la classe des HATs possèdent un domaine acétyltransférase. Les GNAT (dont le facteur associé à CBP/p300) et les CBP/p300 contiennent également un bromo-domaine impliqué dans la reconnaissance et la fixation des résidus lysine acétylés. Les MYST semblent quant à elles posséder un motif à doigt de zinc (Sternier and Berger, 2000) (Lee and Workman, 2007) (**Figure 23**).

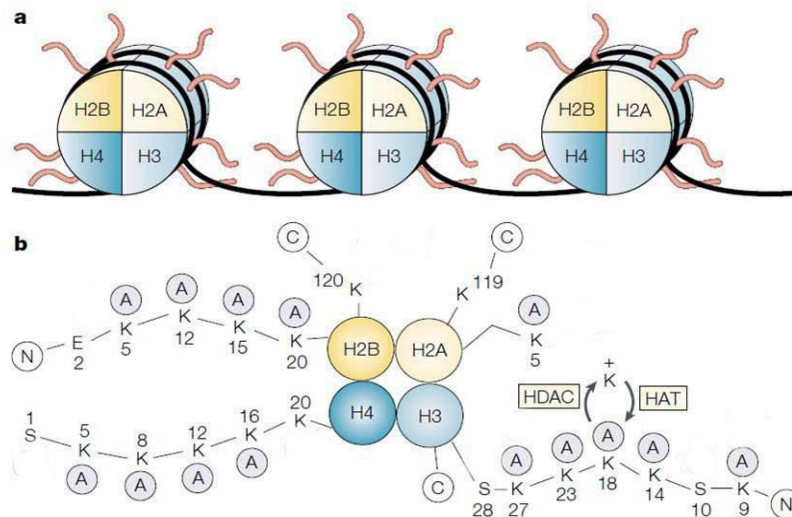


Figure 23 : Représentation schématisée des histones et de leur acétylation. (A) Trois nucléosomes sont schématisés. Chacun d'eux est constitué d'un octamère d'histones représenté avec deux paires de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Autour de chacun des nucléosomes est enroulée une double hélice d'ADN. (B) Représentation des queues des histones avec leurs extrémités C et N- terminales. Les queues N-terminales subissent des modifications épigénétiques comme des acétylations sur les résidus lysines, via des enzymes histones acétyltransférases (HAT), provoquant un relâchement de l'ADN. Ces acétylations sont réversibles et peuvent être supprimées par des enzymes antagonistes des HAT, appelées histone-désacétylases (HDAC) (d'après Marks et al., 2001b).

I. 2. 1. 2) Rôles de l'acétylation des histones

L'acétylation des histones consiste en un transfert réversible d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-coenzyme A sur le groupement ϵ -amino de certains résidus lysine. Toutes les histones peuvent être acétylées sur des lysines spécifiques dans leur domaine N-terminal. Ceci permet de réguler de nombreux processus cellulaires tels que l'assemblage des nucléosomes, la condensation et le repliement de la chromatine ainsi que la transcription des gènes, *via* des sites d'acétylation uniques ou combinés (Shahbazian and Grunstein, 2007).

L'assemblage des nucléosomes est possible grâce à l'intervention de protéines chaperones qui ciblent spécifiquement les histones nouvellement synthétisées produites durant la phase de synthèse (S) du cycle cellulaire, quand l'ADN est répliqué. Ces histones sont rapidement acétylées après leur synthèse pour être reconnues par les protéines chaperones qui protègent les résidus acétylés de l'action des HDACs jusqu'à l'intégration dans la structure nucléosomique. Après l'empaquetage en nucléosome, les histones sont immédiatement désacétylées (Verreault, 2000) (Shahbazian and Grunstein, 2007).

Le **contrôle de degré de condensation de la chromatine** est un autre rôle de l'acétylation

des histones qui a pour conséquence la neutralisation de la charge positive portée par les histones. Ceci conduit à une diminution des interactions entre les queues N-terminales des histones et l'ADN, mais également entre les nucléosomes adjacents. La chromatine est alors décondensée et relâchée (Angelov et al., 2001) (Shahbazian and Grunstein, 2007).

L'acétylation des histones est également un événement critique de **la transcription des gènes**. Elle peut se faire de deux manières différentes : les HATs peuvent être recrutées aux séquences promotrices des gènes par des activateurs de la transcription ou fonctionner de façon globale en parcourant aléatoirement le génome et en ne ciblant pas de promoteur spécifique. Dans ces 2 cas (ciblé ou global), les niveaux de transcription des gènes seront affectés (Kuo et al., 1998) (Shahbazian and Grunstein, 2007).

I. 2. 2) Déacétylation

I. 2. 2. 1) Les HDACs

On distingue actuellement 18 HDACs humaines qui sont réparties en quatre classes (I, II, III et IV), en fonction de leur homologie aux histones désacétylases de levure (Gray and Ekström, 2001) (Drummond et al., 2005) (**Figure 24**). On définit par ailleurs deux familles en fonction de leur dépendance à un cofacteur spécifique donné. La famille dite « classique » regroupe les classes I, II et IV et requiert l'ion Zn^{2+} comme cofacteur tandis que les sirtuines (silent information regulator 2 (Sir-2)-related protein) constituent la classe III et sont dépendantes de l'ion NAD^+ (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003) (Verdin et al., 2003).

Les HDACs de classe I (HDAC 1, 2, 3 et 8), homologues du répresseur transcriptionnel de levures yRPD3 (*yeast Reduced Potassium Dependency 3*), sont exprimées de façon ubiquitaire, et prédominent dans le noyau, même si les HDAC3 sont également retrouvées dans le cytoplasme. Elles agissent essentiellement comme corépresseurs transcriptionnels. Leur taille est comprise entre 350 et 500 aa (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003).

Les enzymes de classe II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10), homologues de yHDA1 (*yeast Histone Deacetylase-1*) de la levure, sont tissu-spécifiques, avec des niveaux plus élevés dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques. Elles peuvent naviguer entre le noyau et le cytoplasme, en réponse à divers signaux cellulaires. Leur taille équivaut approximativement au double de celle des HDACs de classe I et varie de 650 à 1250 aa (de Ruijter et al., 2003)

(Thiagalingam et al., 2003) (Verdin et al., 2003). Les HDAC de classe II sont parfois subdivisées en deux sous-classes : HDACs IIa (HDACs 4, 5, 7 et 9) et HDACs IIb (HDACs 6 et 10). Les HDACs IIa sont caractérisées par la présence d'un domaine qui se lie au facteur de transcription MEF2 (myocyte enhancer factor 2). Ce dernier est retrouvé en particulier au niveau de promoteur de la protéine lytique très précoce de l'EBV, BZLF1, bloquant son expression et par suite la réactivation virale.

Les enzymes de classe III, également appelées sirtuines (SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7), ne montrent aucune similitude avec les HDACs des classes I et II et sont homologues de la protéine de la levure ySIR2 (*yeast Silent Information Regulator 2*), dont l'activité enzymatique dépend de NAD^+ . Elles sont retrouvées aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme et présentent une activité tubuline désacétylase et mono-ADP-ribosyltransférase. Leur distribution varie en fonction des tissus, ce qui suggère que ces enzymes ont différentes fonctions dans la différenciation et le développement cellulaires. Leur taille est comprise entre 300 et 750 aa. Il s'agit de la classe la moins bien caractérisée (Dutnall and Pillus, 2001) (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003) (Saunders and Verdin, 2007).

La dernière enzyme isolée et caractérisée est l'HDAC11. Elle est actuellement le seul membre de la classe IV. Elle possède des homologies à la fois avec les HDACs de classe I et celles de classe II. Son gène est localisé sur le chromosome 3p25 qui est caractérisé par des pertes ou des gains fréquents de matériel chromosomique jouant un rôle dans la genèse de certains cancers (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003) (Verdin et al., 2003) (Voelter-Mahlknecht et al., 2005). De même que les HDACs de la classe I, l'HDAC11 est principalement retrouvée dans le noyau mais comme les HDACs de classe II, elle est surexprimée dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003).

La structure des HDACs est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique conservé à l'exception des HDAC 6 et 10 qui en contiennent deux (**Figure 25**). Cependant, ce second domaine semble être non fonctionnel chez les HDAC10 (Gallinari et al., 2007).

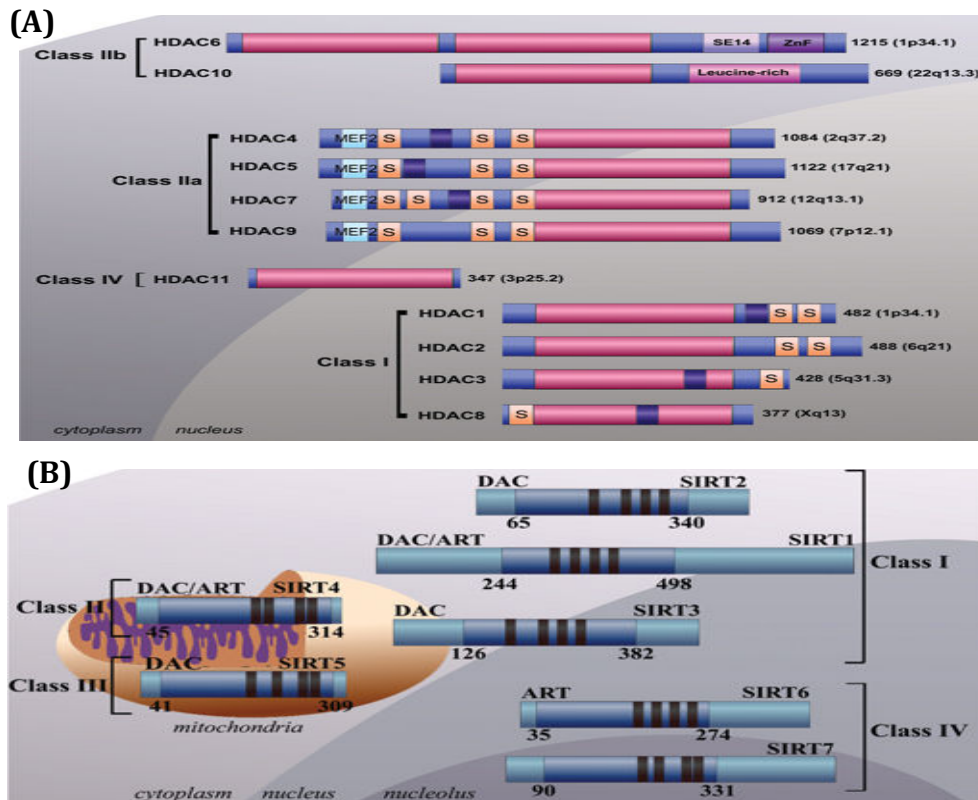


Figure 24 : Représentation schématique des différentes classes d'enzymes HDAC. (A) les HDACs classiques sont catégorisées en classes I (HDAC 1, 2, 3 et 8), IIa (HDAC4, 5, 7 et 9), IIb (HDAC 6 et 10) et IV (HDAC11), en se basant sur leur homologie avec les protéines de levure. Leur domaine catalytique est représenté en rose, le signal de localisation nucléaire en violet, le domaine de liaison à MEF2 (myocyte enhancer factor 2) en bleu clair et le domaine de liaison aux sérines en orange. Le SE14 (sérine-glutamate tétradécapeptide permettant le maintien de la protéine dans le cytoplasme), ZnF (domaine de liaison aux protéines en doigt de Zinc) et les domaines riches en leucine sont représentés. La localisation subcellulaire est également précisée. (B) Les sirtuins (déacétylases de classe III) sont des protéines déacétylases nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) ou ADP-ribosyltransferases (ART) dépendantes très conservées. Elles peuvent être divisées en 4 classes basées sur leur lignage phylogénétique. La localisation cellulaire, le domaine de liaison à NAD^+ (DAC) ou le domaine de liaison à ART sont représenté en bleu foncé et le domaine de liaison au zinc en noir (d'après Karagiannis and Ververis, 2012).

I. 2. 2. 2) Mécanisme d'action des HDACs

Les HDACs conduisent au retrait du groupement acétyl. Le domaine catalytique des HDACs I, II et IV est formé d'environ 390 aa conservés avec une poche catalytique dans laquelle s'insère un ion Zn^{2+} . Pour les HDACs sirtuines de classe III, il est composé d'environ 275 aa avec une poche catalytique dans laquelle s'insère un ion NAD^+ (de Ruijter et al., 2003) (Saunders and Verdin, 2007).

I. 2. 2. 3) Régulation de l'activité des HDACs

Il est crucial pour la cellule que l'activité des HDACs soit étroitement contrôlée. Elle se fait par de multiples mécanismes : l'interaction entre les protéines, les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation), la localisation subcellulaire, le contrôle de l'expression, la disponibilité des cofacteurs, et le clivage protéolytique (Sengupta and Seto, 2004) (Gallinari et al., 2007).

Les HDACs ont divers substrats histoniques et non histoniques, ce qui en fait des régulateurs essentiels pour des processus cellulaires, tels que l'expression des gènes, la croissance cellulaire, la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire (Kouzarides, 1999) (Lehrmann et al., 2002) (Lagger et al., 2003) (Glozak and Seto, 2007). Malgré les nombreux points de contrôle, dans les différents processus cellulaires une expression ou une activité aberrante des HDACs sont fréquemment observées chez les cellules cancéreuses, mettant en évidence un impact non-négligeable des déséquilibres des processus d'acétylation/désacétylation dans le développement des cancers (Johnstone, 2002) (Dokmanovic and Marks, 2005) (Glozak and Seto, 2007).

I. 3) Acétylation/désacétylation et dynamisme de la chromatine

D'une manière générale, l'acétylation des histones par les HATs favorise la transcription des gènes en diminuant les interactions histones/ADN, ce qui facilite la liaison à l'ADN des facteurs de transcription et de la machinerie de transcription. A l'opposé, la désacétylation des histones par les HDACs rend l'ADN inaccessible et entraîne une répression de la transcription (Berger, 2001) (Narlikar et al., 2002) (**Figure 25**).

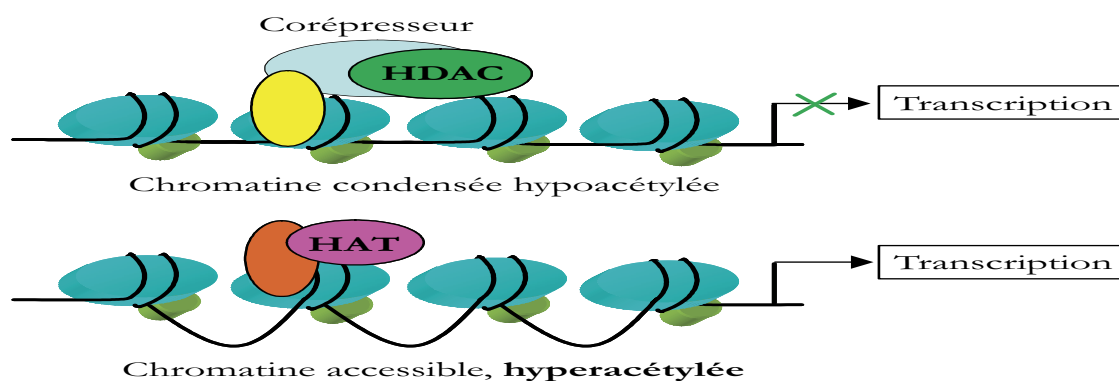


Figure 25 : Rôle des HDACs et des HATs dans l'acétylation des histones et la transcription des gènes (modifiée d'après Wade, 2001).

Le rôle des HATs et des HDACs permettant d'assurer une transcription correcte implique des mécanismes très subtils, qui dépendent notamment des résidus ciblés ainsi que des complexes multiprotéiques *via* lesquels les HATs et les HDACs agissent. En effet, les HAT conservent l'acétylation des queues d'histones au niveau de leurs résidus lysine en s'associant avec des co-activateurs de la transcription et d'autres HAT pour faciliter la transcription des gènes, alors que les HDAC s'associent généralement avec des protéines corépresseurs tels que le complexe MEF2 (myocyte enhancer factor 2) lié aux HDACs de classe II, SMRT, N-CoR ou NURD (**Figure 26**). Les HDAC peuvent ainsi désacétyler les lysines des queues d'histones, compacter les chromatines, et par la suite induire la répression de la transcription des gènes. La désacétylation permet en particulier le blocage de MEF2 au niveau du promoteur du gène très précoce de l'EBV, *BZLF1*, inhibant par la suite la réactivation virale (Murata, 2014). La désacétylation permet également de réprimer les initiations aberrantes au niveau de régions codantes si elles comportent des complexes comprenant Rpd3 (Carrozza et al., 2005) (Clayton et al., 2006) (Shahbazian and Grunstein, 2007).

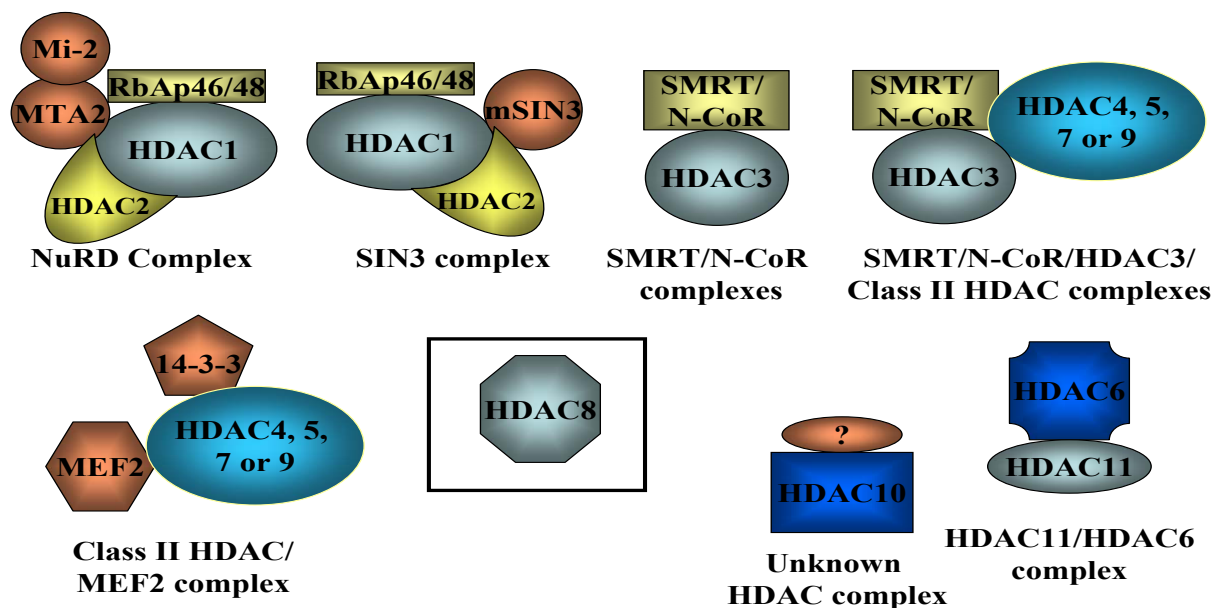


Figure 26 : Les différents complexes impliquant les HDACs. HDAC : histone désacétylase, MEF2 : myocyte enhancer factor 2, MTA2 : metastasis-associated 2, N-CoR : nuclear receptor co-repressor, RbAp46/48 : Retinoblastoma protein associated protein 46/48, SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid receptors.

I. 3. 1) Acétylation/désacétylation des protéines non-histoniques

La démonstration par des analyses phylogénétiques selon laquelle l'apparition des HDACs précède l'évolution des histones, implique la probabilité que l'activité primaire de ces

HDACs est dirigée contre des substrats non-histoniques (Gregorette et al., 2004). De nombreuses études ont mis en évidence une multitude de substrats non-histoniques pour les HATs et les HDACs, notamment des composants du cytosquelette (α - tubuline, actine), des facteurs de transcription (p53, p65, pRB), des protéines chaperones (HSP90, HSP70), des kinases et des phosphatases (c-Abl tyrosine kinase, PTEN phosphatase), des facteurs de l'apoptose (Ku70), des protéines virales (Tat du HIV) ou des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (ADN glycosylase, NBS1). Les fonctions des protéines non-histoniques sont modifiées par ces processus d'acétylation et de désacétylation. Ils influent sur : (1) l'interaction entre protéines, (2) leur potentiel transactivateur, (3) la liaison à l'ADN, (4) la localisation subcellulaire, ou encore (5) la stabilité de la protéine (Lee and Workman, 2007) (Glozak and Seto, 2007) (Yang and Seto, 2007). La désacétylation de l' α - tubuline par l'HDAC6 entraîne par exemple la dépolymérisation des microtubules ce qui favorise la mobilité et la migration des cellules. Il est nécessaire d'en prendre compte dans la prévention contre les métastases, lors de l'utilisation d'HDACi au cours des traitements anticancéreux (Matsuyama et al., 2002) (Hubbert et al., 2002) (Zhang et al., 2003).

II. Inhibiteurs des HDAC (HDACi), exemple du vorinostat

II. 1) Inhibiteurs des HDAC

II. 1. 1) Classes des HDACi

Le rôle majeur que les HDACs peut jouer dans le développement de cancers, suite à leur dysfonctionnement, fait que les HDACi font l'objet de nombreuses études et sont à l'origine d'applications cliniques déjà avancées en onco-hématologie. Cinq classes de HDACi, de structures différentes mais conservant la liaison au zinc des HDAC et entraînant une compétition avec les substrats ou conduisant à une liaison covalente inactivant l'enzyme, sont caractérisées à ce jour. Il s'agit :

- de molécules présentant de courtes chaînes d'acides gras comme le butyrate et le valproate,
- de benzamides dont les chefs de file sont l'entinostat (MS275) et le *p*-*N*-acétyldinaline (CI994),
- d'acides hydroxamiques comme le suberoylanilide hydroxamic acid ou SAHA (également appelé vorinostat et commercialisé sous le nom de Zolinza™, Merck &

Co., Inc.), la trichostatine A (TSA), le panobinostat (LBH589) ou le Belinostat (PXD 101),

- de tétrapeptides cycliques contenant un cycle 2-amino-8-oxo-9,10-époxy-décanoyl comme l'apicidine et la trapoxine A et d'autres tétrapeptides cycliques dépourvus du cycle 2-amino-8-oxo-9,10-époxy-décanoyl comme le depsipeptide (FK-228),
- de depsipeptides cycliques de la classe du largazole synthétisés à partir de molécules isolées de cyanobactéries marines comme les largazole A et B (Kelly et al., 2002b) (Thiagalingam et al., 2003) (Xu et al., 2007) (**Figure 27**).

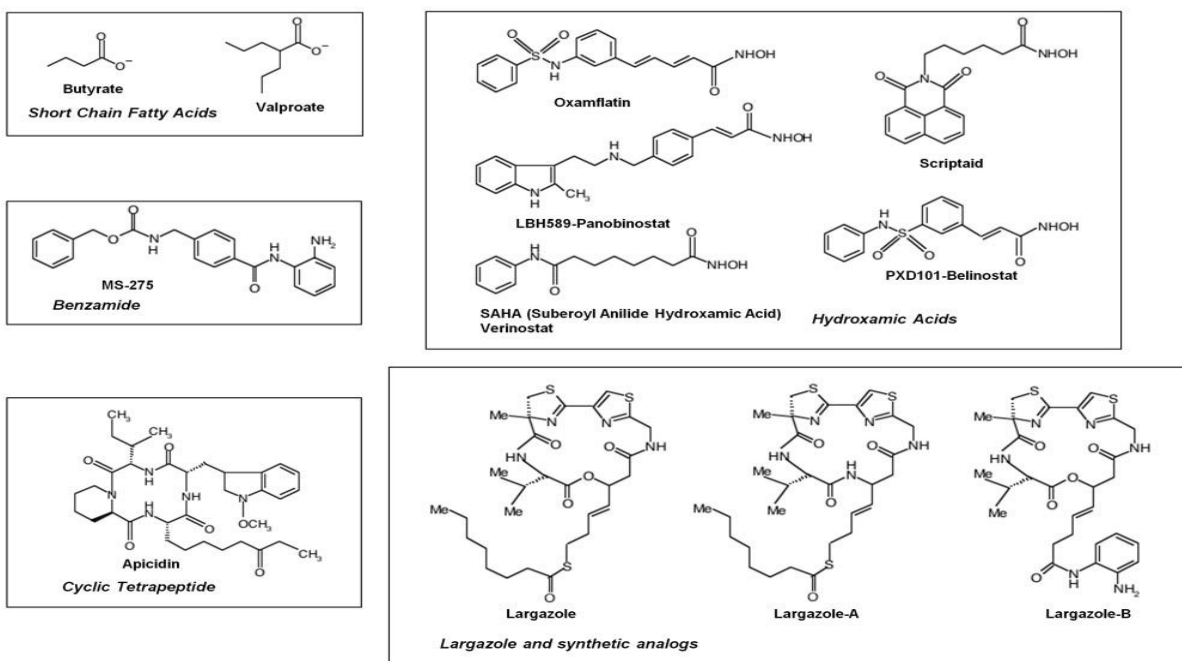


Figure 27 : Les cinq différentes classes des HDACi et la structure chimique des molécules représentatives (d'après Ghosh et al., 2012).

Les HDACi ont des degrés variables de spécificité pour les HDAC dépendantes du Zinc (classes I, II et IV). A la fin des années 70, l'activité désacétylase du butyrate a été montrée comme un inhibiteur non spécifique des HDACs de classe I et IIa, de même que le valproate (autre acide aliphatique) (Candido et al., 1978) (Thiagalingam et al., 2003) (Yang and Seto, 2007). Les acides hydroxamiques SAHA, LBH589, TSA et PXD101 inhibent l'ensemble des HDAC des classes I, II, et IV. Le peptide cyclique « depsipeptide » (classe des largazoles) inhibe seulement les HDAC 1 et 2 (classe I). Et enfin, le benzamide « MS-275 » inhibe les HDAC 1, 2 et 3 (classe I) (Bolden et al., 2006) (**Tableau 5**). Ces HDACi sont actives à des concentrations variables. Le butyrate et le valproate sont utilisés à des concentrations millimolaires, le SAHA et le MS-275 à des concentrations de l'ordre du micromolaire, et la

TSA et le depsipeptide à des concentrations nanomolaires (Xu et al., 2007). Il est à noter que l'action de l'ensemble des HDACi cités est réversible, excepté pour la trapoxin A (molécule à tétrapeptide cyclique) qui bloque irréversiblement les HDACs par liaison covalente au groupement époxycétone (Furumai et al., 2001).

La base moléculaire de l'activité anticancéreuse des HDACi n'est pas encore tout à fait claire. Par ailleurs, la possibilité de disposer de HDACi spécifiques d'une HDAC donnée peut contribuer à élucider le rôle de cette dernière avec une meilleure efficacité et une toxicité réduite. La tubacine (non référencé parmi les 5 classes principales) a par exemple été identifiée pour sa capacité à inhiber spécifiquement, et de manière réversible, l'activité de l'HDAC6 (classe IIb) (Haggarty et al., 2003), induisant l'accumulation d' α -tubuline acétylée, sans affecter ni l'acétylation des histones ni la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Matsuyama et al., 2002) (Hubbert et al., 2002) (Zhang et al., 2003).

Les HDACs de la classe III dont l'activité désacétylase est dépendante de NAD^+ jouent un rôle important dans le contrôle du métabolisme et de la prolifération, ainsi que dans le développement de maladies liées à l'âge comme les maladies oncologiques, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont insensibles aux inhibiteurs classiques (HDACi) mais sont inhibées par le nicotinamide qui bloque l'activité des SIRT par sa liaison à la poche NAD^+ (Saunders and Verdin, 2007) (**Tableau 5**). Les inhibiteurs pharmacologiques de sirtuines structurellement liés au cambinol sont suggérés être d'un intérêt clinique pour traiter les maladies inflammatoires. Le Cambinol a initialement été décrit comme un composé inhibant l'activité de SIRT1 et SIRT2, avec une activité anti-tumorale efficace *in vivo*. Une étude de son effet sur la sensibilité microbienne face aux cellule immunes humaines et murines et sur la réponse immune innée de l'hôte *in vivo* montre que le cambinol inhibe l'expression de cytokines (TNF, IL-1, IL-6, IL-12p40, et IFN- γ), d'espèces oxygénés réactives (NO) et de CD40 par les macrophages, les cellules dendritiques et les splénocytes, suite à une stimulation par une large gamme de stimuli microbiens et inflammatoires. Le sirtinol, un inhibiteur de SIRT1 et SIRT2, structurellement proche du cambinol, a également permis de diminuer la réponse des macrophages suite à la stimulation du TLR (Toll-like receptor). Au contraire, les inhibiteurs sélectifs de SIRT1 (EX-527 et CHIC-35) et SIRT2 (AGK2 et AK-7) utilisés seuls ou en combinaison n'ont pas d'effet inhibiteur, ce qui suggère que le cambinol et le sirtinol possèdent d'autres cibles que SIRT1 et SIRT2. A des concentrations anti-inflammatoires, le cambinol et le sirtinol n'inhibent pas l'activité de SIRT6 *in vitro*. Au niveau moléculaire, le cambinol diminue les stimuli qui induisent la phosphorylation des MAPK et des MEK en

amont. Il a une puissante activité anti-inflammatoire, réduit les taux de TNF sanguins et la bactériémie et améliore la survie dans des modèles précliniques de choc endotoxique et de choc septique (Lugrin et al., 2013).

Tableau 5 : Les différentes classes de HDAC et leurs inhibiteurs chimiques de type HDACi (d'après Carew et al., 2008).

			Class I	Localization	Selected Targets		
			HDAC1	Nucleus	Androgen Receptor p53 MyoD E2F-1 SHP Stat3		
SAHA, TSA, LBH589, PXD101	Valproic Acid, Butyrate	MS-275	Depsipeptide	HDAC2	Nucleus	Glucocorticoid Receptor Bcl-6 YY-1 Stat3	
			HDAC3	Nucleus	RelA YY-1 GATA-1 SHP Stat3		
			HDAC8	Nucleus			
		Tubacin		Class IIa	HDAC4	Nucleus/Cytoplasm	GATA-1 GCMa HP-1
				HDAC5	Nucleus/Cytoplasm	Smad7 GCMa HP-1	
				HDAC7	Nucleus/Cytoplasm	Plag1/Plag2	
				HDAC9	Nucleus/Cytoplasm		
				Class IIb	HDAC6	Mostly Cytoplasm	α -tubulin Hsp90 SHP Smad7
				HDAC10	Mostly Cytoplasm		
				Class IV	HDAC11	Nucleus/Cytoplasm	
Nicotinamide	Cambilol	EX-527	Class III	Sirt1	Nucleus	p53 FOXO NF- κ B PGC-1 α Histone H4 α -tubulin	
			Sirt2	Cytoplasm	Acetyl-CoA synthetases Glutamate dehydrogenase		
			Sirt3	Nucleus/Mitochondria			
			Sirt4	Mitochondria			
			Sirt5	Mitochondria			
			Sirt6	Nucleus	DNA polymerase B		
			Sirt7	Nucleus	RNA polymerase I		

II. 2) Mécanisme d'action des HDACi

Il existe une interaction directe entre l'HDACi et le site actif des HDAC classiques, dépendantes de l'ion Zn^{2+} (classe I, II et IV). L'inhibiteur bloque l'accès au site catalytique de l'enzyme de manière réversible, (excepté pour la trapoxin), et inhibe par la suite l'activité désacétylase (Kelly et al., 2002) (de Ruijter et al., 2003) (Thiagalingam et al., 2003) (Dokmanovic and Marks, 2005). L'étude de l'interaction d'un homologue de HDAC (HDLP, HDAC-like protein) avec la TSA et le SAHA a permis d'étudier les interactions entre les HDACi et leur substrat d'un point de vue structural. Par ailleurs, la structure cristalline

complexe de l'HDAC8 associée à un acide hydroxamique (TSA et SAHA) a été résolue plus récemment (Finnin et al., 1999) (Somoza et al., 2004).

Les HDACi conduisent généralement à une activation de la transcription. Cependant, en fonction de la nature du gène (moins de 10% des cas), il a pu être observé une répression de la transcription (Van Lint et al., 1996) (Glaser et al., 2003) (Nusinzon and Horvath, 2005) (Hildmann et al., 2007). La composition spécifique du complexe de facteurs liés à la transcription (incluant les HDACs) semble en être responsable. Il a été montré que le TSA ou le SAHA peuvent entraîner une augmentation de l'expression de p21 (inhibiteur de CDK), accompagnée d'une diminution de l'expression de la thymidylate synthétase (qui est impliquée dans la synthèse de l'ADN), conduisant à un arrêt du cycle cellulaire (Glaser et al., 2003). Par ailleurs, les gènes, dont l'activation transcriptionnelle est induite par STAT5, sont réprimés par le TSA (Rascle et al., 2003) et ce dernier, de même que le butyrate, induit un complexe répresseur conduisant à la répression de la transcription du récepteur à l'androgène (AR) (Wang et al., 2004).

L'activité désacétylase des sirtuines peut être réprimée par diverses molécules. Le domaine catalytique, où ont lieu le clivage du NAD^+ pour la désacétylation et l'inhibition du nicotinamide, joue un rôle important dans la régulation des sirtuines par divers régulateurs physiologiques. Le nicotinamide est un produit de dégradation et également un inhibiteur non-compétitif de cette famille de protéines. Des levures cultivées en présence de nicotinamide présentent une réduction importante de « *gene silencing* », une augmentation du taux de recombinaison de l'ADNr et une durée de vie diminuée. Chez l'Homme, dans le cas de cancers, les inhibiteurs de sirtuines empêchent la désacétylation de p53 et induisent l'apoptose. Le sirtinol est le premier inhibiteur identifié grâce au criblage d'une banque de mille six cents molécules, il s'agit d'un dérivé du 2-hydroxy-1-naphthaldéhyde. Ce dernier est efficace avec des valeurs d'IC50 de 68 μM et de 38 μM respectivement pour la Sirt2 de levure et la Sirt2 humaine (Grozing et al., 2001). De nombreuses autres molécules (splitomycine, cambinol, surfactine,...) ont été identifiées grâce aux criblages d'inhibiteurs potentiels des sirtuines. Elles sont plus ou moins efficaces et spécifiques, mais sont le point de départ pour l'optimisation de molécules, permettant de mettre en place d'éventuelles applications thérapeutiques (Sanders et al., 2009).

II. 3) HDACi et cancer

II. 3. 1) Rôle anti-tumoral des HDACi

Les HDACi, permettent d'inhiber les HDAC, dont les altérations de fonction ou d'expression sont étroitement impliquées dans les processus d'initiation et de progression des cancers, ce qui en fait une classe prometteuse d'agents anticancéreux. Ils permettent de lever la répression imposée par les HDACs sur certains promoteurs (**Figure 28**). Les HDAC répriment souvent les gènes de suppression de tumeurs, d'inhibiteurs du cycle cellulaire, de facteurs de différenciation ou d'inducteurs de l'apoptose, qui favorisent la prolifération, inhibe la différenciation et l'apoptose et contribue à l'angiogénèse et à la migration cellulaire, tout en diminuant l'adhésion cellulaire (Kelly et al., 2002).

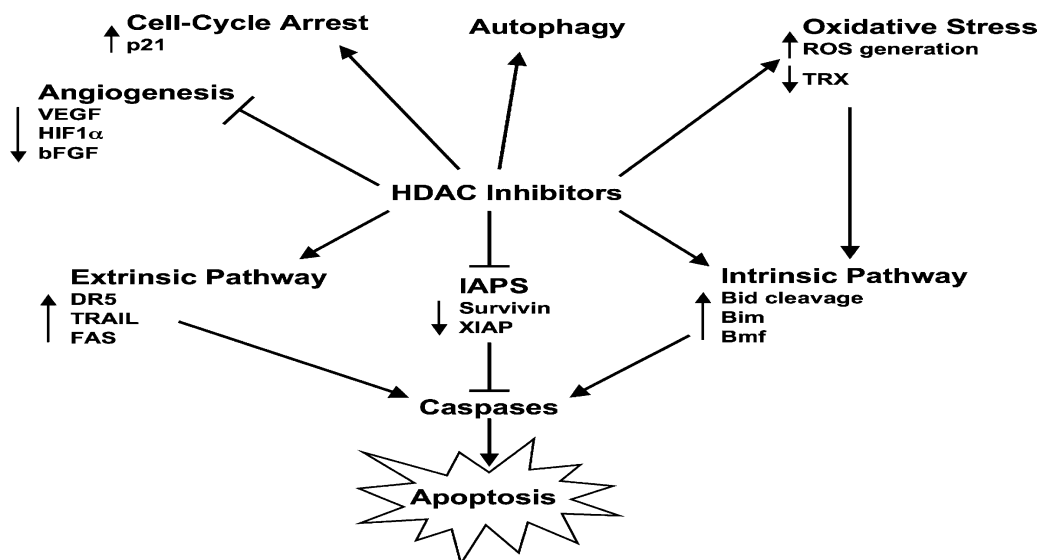


Figure 28 : Mécanismes d'induction de la mort cellulaire par les HDACi. Les inhibiteurs de HDAC ont une multitude d'effets sur les cellules cancéreuses. Ils induisent p21 ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire, principalement en phase G1. Ils induisent également l'apoptose *via* les voies extrinsèque (récepteur de mort) et intrinsèque (mitochondrial). L'apoptose stimulée par les HDACi est associée à une expression accrue de gènes pro-apoptotiques et une diminution de l'expression de gènes anti-apoptotiques. Les HDACi améliorent ainsi l'efficacité de nombreux agents anticancéreux classiques pro-apoptotiques. Les HDACi conduisent à la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui semblent jouer un rôle important dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Elles inhibent également l'angiogénèse et induisent l'autophagie. Cependant, des données récentes suggèrent que la stimulation de l'autophagie par les HDACi peut favoriser la survie et réduire l'efficacité thérapeutique car son inhibition peut potentialiser la mort cellulaire induite par les HDACi (d'après Carew et al., 2008).

Les HDACi influencent différents processus cellulaires :

- **Arrêt du cycle cellulaire.** La prévention contre le cancer nécessite une restriction de la prolifération cellulaire. Les HDACi permettent de limiter cette prolifération par induction de l'expression de deux facteurs importants pour la régulation de la croissance cellulaire : p21 et TGF- β (Transforming Growth Factor- β). p21 est une protéine inhibitrice des CDK à activité anti-proliférative et est la plus étudiée. Indépendamment de p53, et en corrélation avec une hyperacétylation des histones H3 et H4 dans sa région promotrice, la transcription du gène de p21 est augmentée. Ceci a été observé lors du traitement par différents HDACi et pour plusieurs types de cellules cancéreuses. Une réduction de la liaison de HDAC1 et de c-myc (inhibiteur de p21) sur le promoteur de p21, associée à une augmentation du recrutement de l'ARN Polymérase II, sont observées. L'inhibition des CDK par p21 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et le blocage de la prolifération (Sambucetti et al., 1999) (Richon et al., 2000) (Gui et al., 2004) (Ocker and Schneider-Stock, 2007) (Li and Wu, 2004).
- **Différenciation.** La prévention contre le cancer nécessite de surmonter le problème de l'inhibition de la différenciation qui est également à l'origine d'une prolifération inappropriée des cellules cancéreuses. La perte de facteurs de différenciation de la famille GATA est observée dans plusieurs types de cancers. Un traitement par le TSA restaure l'expression de ces facteurs de différenciation et de leurs cibles (dont le suppresseur de tumeur Dab2), suite à une hyperacétylation des promoteurs des histones H3 et H4 par les HDACi (Caslini et al., 2006).
- **Apoptose.** Les HDACi permettent également de prévenir contre le cancer en favorisant l'apoptose, que ce soit par la voie extrinsèque des récepteurs ou la voie intrinsèque mitochondriale.
La voie extrinsèque est initiée par la fixation de ligands, FasL, TNF α (Tumor Necrosis Factor α) ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), sur leurs récepteurs de mort respectifs : Fas, récepteur au TNF (TNFR-1) ou récepteur à TRAIL. Ceci conduit à l'activation des caspase-8 et caspase-10 initiatrices, à l'origine du processus d'apoptose. Les HDACi permettent d'augmenter l'expression des récepteurs et des ligands des cellules transformées, par comparaison aux cellules normales (Nakata et al., 2004) (Ashkenazi, 2002).

Concernant la voie intrinsèque de l'apoptose, elle est en partie régulée par les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille bcl-2, et due au relargage de protéines mitochondriales comme le cytochrome c ou l'AIF (apoptosis inducing factor), ce qui conduit à l'activation de la caspase 9 initiatrice de l'apoptose (Jiang and Wang, 2004). Les HDACi induisent la surexpression de certains facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (notamment Bim et Bax) et la sous-expression de facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (notamment Bcl-2 et Bcl-X_L) (Xu et al., 2006) (Zhang et al., 2004). Des études ont montré que l'acétylation de Ku70 (qui séquestre Bax dans le cytoplasme) par CBP et PCAF, conduit à la libération de Bax qui migre vers la mitochondrie et initie l'apoptose. De même, le traitement par des HDACi peut provoquer une apoptose dépendante de Bax chez plusieurs types cellulaires (Cohen et al., 2004) (Subramanian et al., 2005). Les processus d'apoptose associés aux HDACi seront décrits plus en détail ultérieurement.

- **Angiogenèse.** La prévention contre le cancer nécessite également de moduler les gènes responsables de la progression de la tumeur, dont ceux contrôlant l'angiogenèse. Les HDACi jouent un rôle important dans la suppression de la néovascularisation des tumeurs en altérant les gènes directement impliqués dans l'angiogenèse. Leurs propriétés anti-angiogéniques se manifestent par une diminution de l'expression des gènes pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor- 1 α) (Deroanne et al., 2002) (Bolden et al., 2006).
- **Migration cellulaire.** La migration cellulaire joue un rôle important dans la formation de métastases. L'inhibition d'HDAC6 permet de prévenir la migration des cellules en augmentant leur adhésion. Le HDAC6 désacétyle l' α -tubuline, ce qui entraîne la dépolymérisation des microtubules, nécessaire à la migration. A l'inverse, l'hyperacétylation de l' α -tubuline par des HDACi est corrélée à une grande stabilité et à une forte adhésion cellulaire (Haggarty et al., 2003) (Tran et al., 2007).

II. 3. 2) Spécificité des HDACi pour les cellules tumorales

Contrairement aux drogues chimiothérapeutiques conventionnelles qui ciblent les cellules en prolifération en se basant sur de petites différences entre les cellules tumorales et les cellules normales, les HDACi présentent une cytotoxicité quasi-sélective pour les cellules tumorales et immortalisées. Ils agissent à des concentrations pour lesquelles les cellules normales sont

relativement résistantes. Les HDACi peuvent avoir un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses en prolifération ou ayant un indice mitotique faible alors que les cellules normales sont environ dix fois plus résistantes (Ungerstedt et al., 2005) (Burgess et al., 2004). La manière dont les cellules normales résistent aux HDACi n'est pas encore très claire. La capacité d'inhibition de l'activité des HDACs par les HDACi semble similaire pour les cellules tumorales (proliférantes ou non) et les cellules normales et l'acétylation des histones est observée dans les deux cas (Marks et al., 2001b). Le type cellulaire, ainsi que la structure et la concentration de l'HDACi, semblent déterminer la manière de réagir des cellules transformées. Les cellules normales semblent être capables de compenser de manière plus efficace les changements induits par les HDACi (Xu et al., 2007).

Une hypothèse récente se basant sur l'inhibition de Trx (Thioredoxin) et l'accumulation de ROS (Reactive Oxygen Species) dans les cellules cancéreuses a été formulée pour expliquer cette spécificité tumorale.

L'inhibition de Trx est due à sa liaison à la protéine TBP-2 (Trx Binding Protein-2), contrairement aux cellules normales. Le traitement par les HDACi permet l'augmentation de TBP-2 dans les cellules tumorales et donc l'inhibition de Trx. Les ROS, qui ne sont plus bloqués par Trx, s'accumulent alors et activent ASK1 (Apoptosis Signaling Kinase 1) qui va à son tour activer deux MAP kinases pro-apoptotiques, p38 et JNK. Trx semble être un déterminant essentiel de la sensibilité des cellules à la mort cellulaire induite par les HDACi (Ungerstedt et al., 2005) (Dokmanovic and Marks, 2005).

II. 4) Vorinostat et traitement des cancers

II. 4. 1) Le Vorinostat, un puissant HDACi

Le lymphome T cutané est la première pathologie pour laquelle la Food and Drug Administration (FDA) a donné son agrément en 2006 pour son traitement par un HDACi, le vorinostat ou acide subéroylanilide hydroxamique (SAHA), commercialisé sous le nom de Zolinza (Kim and Bae, 2011) (Xu et al., 2007) (Glaser, 2007). Cet inhibiteur de l'activité de certaines HDAC a subi au préalable une évaluation lors de multiples essais cliniques de phases I et II. Il s'agit d'un composé d'acide hydroxamique linéaire de petit poids moléculaire (<300) (**Figure 29A**) qui inhibe l'activité des HDAC, induisant de ce fait l'accumulation d'acétylation des histones ainsi que de protéines non histoniques. Il bloque la prolifération des cellules en culture et permet d'inhiber la croissance tumorale chez différents modèles

animaux. Le vorinostat est un inhibiteur oral concurrentiel à large spectre des HDAC de classe I (1, 2, 3 et 4), II (6,8) et selon certain auteurs de classe IV. De même que les autres HDACi en développement clinique, le vorinostat n'inhibe pas les HDAC appartenant à la classe III.

Des études de cristallographie aux rayons X ont permis de montrer que le vorinostat inhibe l'activité des HDAC par son insertion dans la poche contenant le site catalytique de l'enzyme (**Figure 29B**). Sa complexation au zinc est vraisemblablement une des raisons pour laquelle il inhibe les HDAC de classes I et II (dépendantes de l'ion Zn^{2+}) et non les enzymes de classe III (dépendante de NAD^+), de même que la plupart des HDACi hydroxamiques (Finnin et al., 1999) (Richon, 2006).

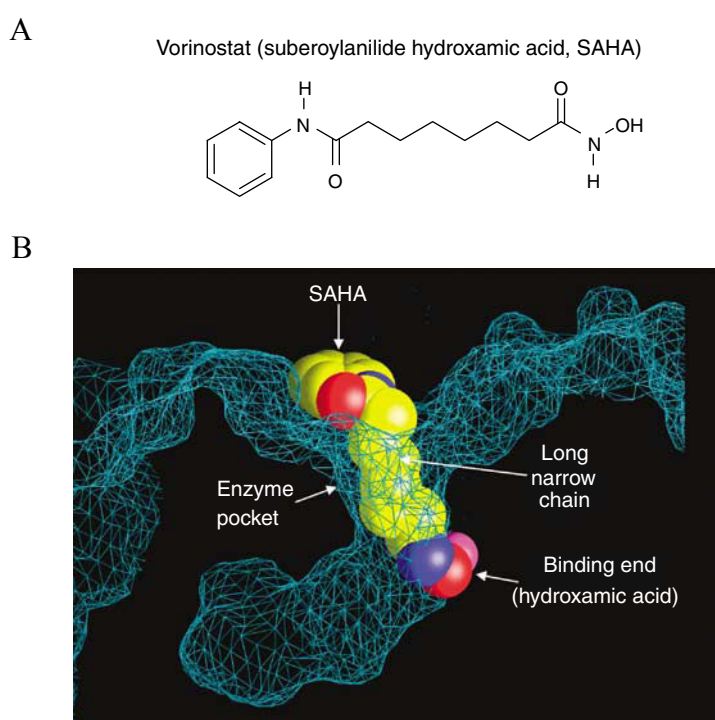


Figure 29 : Structure chimique du vorinostat (ou SAHA) et insertion dans la poche contenant le site catalytique des HDAC. (A) Structure chimique. (B) Un fragment du vorinostat (représenté en rose) se lie à un atome de zinc du site catalytique permettant au reste de la molécule (le groupe phényle) de se poser à la surface de l'HDAC (d'après Richon, 2006).

II. 4. 2) Activité antitumorale *in vitro*

Le vorinostat a été décrit comme pouvant inhiber la prolifération d'une grande variété de cellules transformées *in vitro*, dont des cellules de lymphome, de myélome, de carcinomes ou de cancers du poumon à cellules non petites (**Tableau 6**). Une inhibition de 50% de la

prolifération a été observée pour des concentrations allant d'environ 0,5 à 10 mM (Kelly et al., 2005). Les effets inhibiteurs du vorinostat sur la prolifération cellulaire peuvent varier pour différentes lignées provenant d'un même type de tumeur. Cette variabilité est illustrée par les résultats récents de Koeffler montrant que le vorinostat inhibe de manière importante, mais variable, la prolifération de cellules de lymphomes et de leucémie, dont des cellules de lymphome de Burkitt, de leucémie aiguë lymphoblastique de type B (LAL-B), de lymphomes du manteau (mantle cell lymphoma ou MCL), de lymphomes B diffus de grandes cellules (DLBCL), de leucémie/lymphomes T de l'adulte (ATL) et de lymphocytes T (Sakajiri et al., 2005). Dans le cas de DLBCL, la concentration permettant une inhibition à 50% de la prolifération cellulaire (ou IC50) est par exemple de 0,83 mM pour la lignée SUDHL6 et de 1,9 mM pour la lignée SUDHL16.

Tableau 6 : Différents types des cellules tumorales dont la prolifération est inhibée *in vitro* par le vorinostat (d'après Richon, 2006).

Lymphoma	Breast adenocarcinoma
Myeloma	Pancreatic cancer
Leukaemia	Glioblastoma
Mesothelioma	Prostate cancer
Non-small cell lung carcinoma	Ovarian cancer
Bladder carcinoma	Melanoma
Colon carcinoma	Renal cell carcinoma
Thyroid cancer	Endometrial cancer

En plus d'inhiber la prolifération des cellules transformées et contrairement aux autres HDACi, le vorinostat peut également inhiber la prolifération de cellules normales, comme cela a été montré pour des fibroblastes normaux du poumon humain (lignée WI-38), comparativement aux mêmes cellules transformées par le grand antigène T du SV40 (lignée VA-13) (Ungerstedt et al., 2005). Il a pu être montré une inhibition dose-dépendante de la prolifération pour ces deux types de lignées. Cependant, même si la croissance est inhibée dans les deux cas, un effet cytotoxique n'est retrouvé que dans le cas des cellules transformées (mort des cellules tumorales, tandis que les cellules normales restent viables) (Marks et al., 2001a). La raison de cette cytotoxicité sélective reste incomplètement comprise, cependant, cette étude montre un rôle important de la thiorédoxine (Trx).

II. 4. 3) Activité antitumorale *in vivo*

Il a été montré que le vorinostat peut inhiber la croissance tumorale, à la fois par administration parentérale et par voie orale, pour une variété de tumeurs solides ou

hématologiques chez des modèles animaux de rongeurs. Ceci a pu être observé pour le cancer de la prostate, la leucémie aigue promyélocytaire, le cancer du sein, le gliome ou le cancer du poumon (Eyüpoglu et al., 2005) (He et al., 2001) (Butler et al., 2000) (Cohen et al., 1999) (Cohen et al., 2002). Cette inhibition a lieu à des doses de vorinostat qui sont peu ou pas toxique pour l'animal, comme évaluée par le gain de poids, des études histologiques et l'examen anatomique de tissus et d'organes à l'autopsie. Le vorinostat administré dans l'alimentation a été montré comme pouvant inhiber le développement de tumeurs mammaires induites chez le rat par la molécule cancérigène N-méthylnitrosourée. L'administration de vorinostat permet de diminuer l'incidence des tumeurs et d'inhiber la croissance des tumeurs mammaires établies (Cohen et al., 1999) (Cohen et al., 2002).

Le vorinostat a également permis de supprimer la croissance d'une tumeur humaine androgéno-dépendante de prostate (CWR22) transplanté chez des souris nude (Butler et al., 2000). A la dose de 50 mg Kg⁻¹ jour⁻¹, le volume final moyen de la tumeur a été diminuée de 97%, comparativement aux témoins pour lesquels il n'a pas été détecté de toxicité. Une augmentation d'acétylation des histones a été observée dans les tumeurs CWR22 après 6 h d'administration de vorinostat. Sur la base des études menées chez l'animal, le vorinostat a été évalué lors d'essais cliniques (phases I et II) chez des patients atteints de tumeurs solides et de tumeurs malignes hématologiques, dont le lymphome T cutané (Duvic et al., 2005) (Kelly et al., 2005) (Kelly et al., 2003).

II. 4. 4) Influence sur la signalisation cellulaire

L'effet antiprolifératif du vorinostat est considéré comme le résultat de l'inhibition de l'activité des HDAC, ce qui entraîne l'accumulation de protéines acétylées, dont les histones. L'inhibition de l'activité des HDAC par le vorinostat a de multiples effets cellulaires (Secrist et al., 2003) (Johnstone and Licht, 2003). Ces derniers comprennent une altération de la transcription d'un nombre fini de gènes (2-5% de gènes exprimés) par acétylation des histones et de facteurs de transcription, ainsi que des effets non transcriptionnelle tels que l'arrêt du cycle cellulaire par inhibition de la mitose (Marks et al., 2004) (**Figure 30**). Le vorinostat module l'expression de différents gènes. Certains sont induits, tels que ceux codant pour l'inhibiteur de l'apoptose P21WAF1, le TBP-2 (Thioredoxin-binding protein-2) impliqué dans différentes fonctions biologiques clés (croissance cellulaire, métabolisme des lipides associé au vieillissement cellulaire), la gelsoline (protéine de liaison à l'actine), la

métallothionéine 1L (protéine de liaison aux métaux lourds comme le mercure) ou l'histone H2B. A l'opposé, d'autres gènes sont réprimés par le vorinostat tels que ceux codant pour la cycline D1 (participation à la régulation de la progression dans le cycle cellulaire), le récepteur de la tyrosine kinase ErbB2, la thymidylate synthétase (enzyme catalysant la conversion de deoxyuridine monophosphate dUMP en deoxythymidine monophosphate dTMP) ou l'importine- β (contribution à l'importation des protéines ribosomales vers le noyau). L'induction de l'expression du gène de l'inhibiteur de kinase p21WAF1 a été observée pour différents HDACi, dont le vorinostat et peut jouer un rôle crucial dans l'arrêt de la croissance des cellules transformées (Richon et al., 2000). Pour les cellules T24 de carcinome de la vessie, cela se traduit par une augmentation d'un facteur neuf de l'expression de l'ARNm et de la protéine p21WAF1. Cet effet semble être dû en partie à une augmentation du taux de transcription du gène responsable de l'acétylation des histones H3 et H4 associées au promoteur du gène *p21WAF1* (Richon et al., 2000) (Gui et al., 2004).

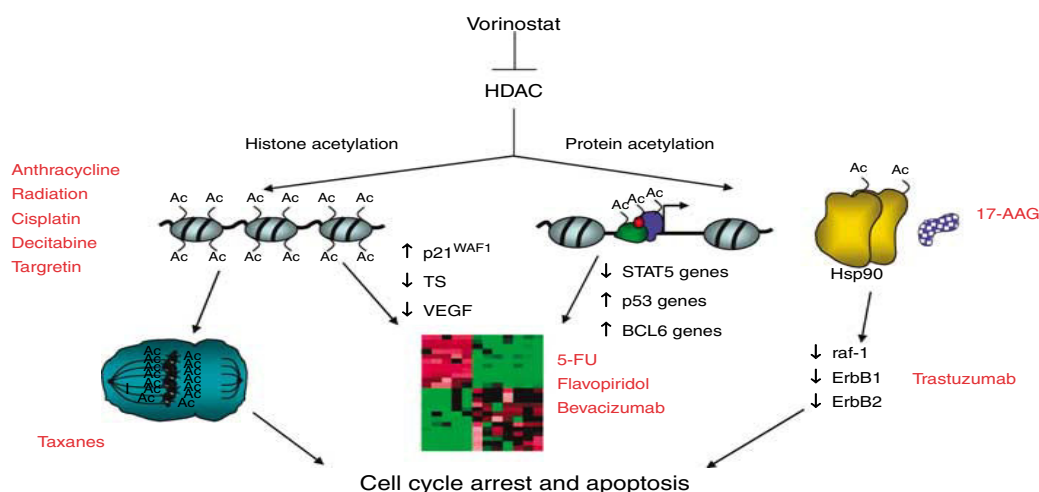


Figure 30 : Mécanisme d'action proposé pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules tumorales par le vorinostat. En inhibant l'action des HDAC, le vorinostat conduit à l'acétylation des histones et de protéines non histones et à la régulation de l'expression de nombreux gènes favorisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée des cellules en apoptose. BCL6 (B-cell lymphoma 6), ErbB1 (également nommé epidermal growth factor receptor, EGFR), ErbB2 (également nommé HER2 chez les humains et neu chez les rongeurs), STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), TS (thymidylate synthase), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Les molécules indiquées en rouge permettent de potentialiser l'action du vorinostat (d'après Siegel et al., 2009).

Le vorinostat peut également favoriser l'acétylation de nombreux facteurs de transcription, y compris des récepteurs aux androgènes, tels que E2F-1, YY1 (ying yang 1), Smad7 (Mothers

against decapentaplegic homolog 7), EKLF (Erythroid Krüppel-like factor), p53, BCL-6 (B-cell lymphoma 6), HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1), NF-Y (nuclear factor Y), NF-kappaB et GATA-1 (Secrist et al., 2003) (Marks et al., 2001a). De même que l'acétylation des histones, l'acétylation des facteurs de transcriptions peut entraîner une altération de l'expression de certains gènes. Par exemple, l'acétylation de l'activateur transcriptionnel p53 entraîne une augmentation de la liaison de p53 à l'ADN, qui à son tour, augmente l'expression de gènes régulés par p53. Les patients atteints de lymphomes montrent une activité accrue du facteur de transcription répresseur BCL6 et une acétylation de BCL6 qui peuvent donner lieu à l'expression des gènes normalement réprimés par BCL6 (Bereshchenko et al., 2002).

En plus des histones et des facteurs de transcription, des HDACi ont également été montré comme pouvant acétyler les résidus lysine d'un certain nombre de protéines, y compris l' α -tubuline et la protéine de choc thermique Hsp90. Dans les cellules leucémiques humaines, l'inhibition de l'activité de HDAC6 par le vorinostat conduit à l'acétylation et à la perturbation de la fonction de Hsp90, ce qui peut conduire à une diminution de la croissance cellulaire et à une baisse de la synthèse de protéines associées à la survie, telles que Bcr-Abl, c-Raf et AKT.

Les HDACi ont également une influence sur la capacité des cellules tumorales à réaliser la mitose (Secrist et al., 2003). En provoquant une augmentation de l'acétylation des histones et d'autres protéines, les HDACi peuvent perturber le cycle cellulaire et induire l'apoptose des cellules tumorales en ciblant des points de contrôles du cycle cellulaire (un point de contrôle G2 souvent défectueux dans les cellules tumorales, et un point de contrôle du fuseau mitotique) (Warrener et al., 2003). Des études *in vitro* indiquent que les HDACi perturbent la fixation des chromosomes au fuseau mitotique, conduisant à leur accumulation dans la cellule sans que les microtubules ne soient affectées (Sandor et al., 2000). De même que pour les autres HDACi, l'apoptose induite par le vorinostat conduit au clivage de BID (à l'origine de l'apoptose intrinsèque mitochondriale) et est caspase dépendante). Par contre, l'apoptose est généralement inhibée pour les cellules exprimant une Pgp fonctionnelle (glycoprotéine responsable de l'efflux des drogues anticancéreuses et associée au phénotype de multi-drogue résistance ou MDR), ce qui n'est pas observé pour le vorinostat, et en fait un argument en faveur de son utilisation dans le cas de tumeurs qui expriment un phénotype de résistance de type MDR (Ruefli et al., 2001) (Ruefli et al., 2002).

Des recherches plus poussées sur le mode d'action du vorinostat ainsi que sur la délimitation de son utilité clinique dans divers types de cancer devraient permettre de définir la manière de

l'employer en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques, avec des effets synergiques ou additifs. Sur la base de son mécanisme d'action, le vorinostat a le potentiel de pouvoir être associé à différents types de traitements anticancéreux, tels que les radiations, les anthracyclines, le cisplatine, les taxanes, le 5-fluorouracile (5-FU), le flavopiridol, le bévacicumab ou le trastuzumab (**Figure 30**). Des études préliminaires réalisées sur des cellules tumorales en culture suggèrent que le vorinostat peut effectivement avoir des effets additifs et synergiques avec la radiothérapie (radiations ionisantes), ou des agents chimiothérapeutiques permettant d'inhiber la prolifération ou d'induire l'apoptose, tels que des inhibiteurs de kinase et des agents de différenciation (Chinnaiyan et al., 2006) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Traitements employés en combinaison avec le vorinostat pour potentialiser son effet anti-cancereux (d'après Richon, 2006).

Study	Combination	Cell lines
Almenara et al (2002)	Vorinostat+flavopiridol	Leukaemia (U937)
Kim et al (2003)	Vorinostat+VP-16, ellipticine, doxorubicin, or cisplatin	Human glioblastoma (D54), breast (MCF-7)
Nimmanapalli et al (2003)	Vorinostat+imatinib	Chronic myelocytic leukaemia (LAMA-84)
Rahmani et al (2003)	Vorinostat+Hsp90 antagonist (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)	Human leukaemia (U937).
Marchion et al (2004)	Vorinostat+topoisomerase II inhibitors	Breast
Rundall et al (2004)	Vorinostat+NF-kappaB inhibitor (BAY-11-7085)	NSCLC (A549, H157, H358, H460, H1299)
Chinnaiyan et al (2005)	Vorinostat+radiation	Prostate (DU145) and glioma (U373vIII)
Ocker et al (2005)	Vorinostat+5-FU+irinotecan	Hepatoma (HepG2, Hep1B and MH-7777A)
Rahmani et al (2005)	Vorinostat+perifosine	Leukaemia (U937, HL-60 and Jurka)

III. HDACi et apoptose

Au cours de la dernière décennie, les HDACi se sont avérés être de puissants inducteurs de l'arrêt de la prolifération, de la différenciation et/ou de la mort par apoptose des cellules transformées *in vitro* et *in vivo*. Ces agents peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses chez des modèles animaux. Plusieurs iHDAC, en particulier ceux à base d'acide hydroxamique tel que le vorinostat, ont de plus permis d'inhiber la croissance des tumeurs à des doses qui sont apparemment non toxiques pour l'animal et qui semblent être sélectives des cellules cancéreuses (Marks et al., 2000) (Chen et al., 2015).

III. 1) Apoptose cellulaire

III. 1. 1) Généralités

Dans notre organisme, des millions de cellules vont proliférer et d'autres mourir chaque jour. La mort cellulaire au sein de tissus par des processus d'apoptose a été décrite dès 1842 par

Vogt et le terme d'apoptose a été utilisé dès 1972 par le groupe de Kerr.

Aussi connue sous le nom de mort cellulaire programmée (PCD), l'apoptose décrit la mort cellulaire provoquée lors de stimulations physiologiques ou pathologiques. Il s'agit d'un processus essentiel au fonctionnement normal d'un organisme, en particulier dans la régulation de la croissance et de la maintenance de l'homéostasie tissulaire des organismes. Un déséquilibre entre la mort cellulaire et la prolifération peut être à l'origine de nombreuses pathologies aiguës (accident vasculaire cérébral, crise cardiaque, insuffisance hépatique), de cancers, de syndromes neurodégénératifs et autres.

Deux processus d'apoptose sont identifiés : des processus d'apoptose caspase-indépendants n'impliquant pas les caspases ou caspase-dépendants. Pour l'apoptose caspase-dépendante, on distingue les processus initiés par la voie des récepteurs (dite voie extrinsèque) et ceux initiés au niveau mitochondrial (dite voie intrinsèque).

III. 1. 2) Apoptose indépendante des caspases

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose indépendante des caspases ne sont pas encore clairement identifiés. L'augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) semble en être le facteur principal. En effet, le granzyme A, les radiations UV ou une infection bactérienne peuvent induire des dommages mitochondriaux et la production de ROS. Ceci va permettre la translocation au noyau du complexe SET associé au réticulum endoplasmique. Ce complexe, comprenant l'oncoprotéine SET, la protéine de liaison à l'ADN HMG-2, l'endonucléase Ap1 et la protéine suppresseur de tumeur pp32, conduit au clivage de l'ADN simple brin et contribue ainsi à une apoptose caspase indépendante (Martinvalet et al., 2005). D'autres part, les ROS permettent l'activation de PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase 1) qui initie un signal nucléaire conduisant à la libération par la mitochondrie de la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor). Cette dernière a été également montrée comme déclencheur de l'apoptose indépendante des caspases : transloquée au noyau après sa libération, l'AIF induit le clivage de l'ADN et la mort cellulaire par apoptose (Kang et al., 2004). Le glutathion (GSH) et l'oxyde nitrique (NO), dont l'interaction peut être à l'origine de la production de ROS, peuvent également jouer un rôle dans ce même processus. D'autres signaux moléculaires, ayant pour origine la perméabilisation de la membrane lysosomale, certaines protéines virales ou certains médicaments, peuvent également agir comme des facteurs apoptogènes impliquant la voie indépendante des caspases (**Figure 31**).

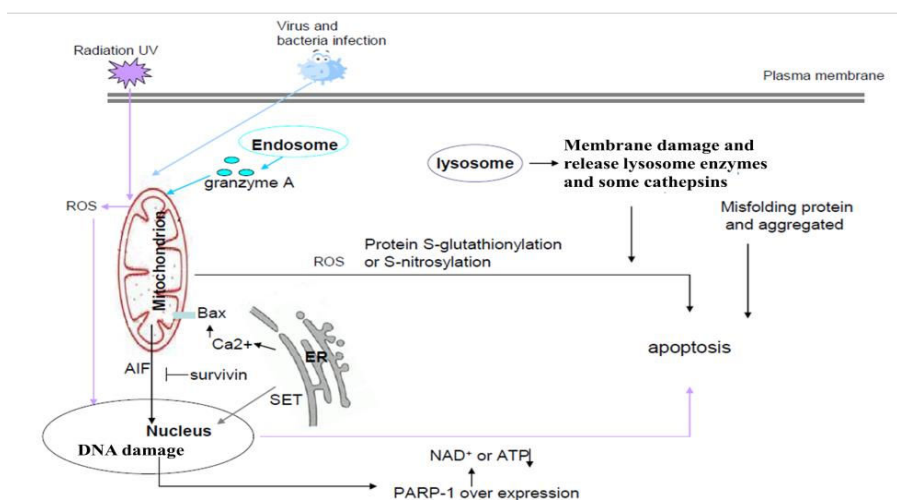


Figure 31 : Voie apoptotique caspase-indépendante. Les signaux externes (radiations ou chimiques) conduisent à un endommagement des organites (lysosomes, mitochondries, noyaux,...) et à la production des molécules pro-apoptotiques (ROS, AIF, Bax, ...) aboutissant à une apoptose indépendante des caspases. PARP-1: Poly (ADP-ribose) polymérase 1, ER: reticulum endoplasmique, ROS: reactive oxygen species, AIF: Apoptosis inducing factor (d'après Hongmei, 2012).

III. 1. 3) Apoptose extrinsèque dépendante des caspases

La liaison de ligands spécifiques comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor), le FasL (Fas ligand) et le TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) à leurs récepteurs (TNFR, Fas, DR4/DR5, respectivement), appelés «récepteurs de mort» ou DR (Death Receptor) (Mahmood and Shukla, 2010), initie l'apoptose extrinsèque. Les DR font partie de la superfamille des récepteurs au TNF et possèdent un domaine de mort cytosolique conservé ou DD (Death Domain) (Mc Guire et al., 2011). Ils sont divisés en deux groupes, en fonction des protéines adaptatrices cytosoliques recrutées aux complexes intracellulaires formés (French and Tschopp, 2003) (Wajant, 2003) (Mahmood and Shukla, 2010).

Le premier groupe, comprend Fas/CD95, DR4/TRAIL-R1 et DR5/TRAIL-R2. Il conduit au recrutement intracellulaire du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Ce dernier est composé de la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et des procaspases initiateuses 8 et 10 (Kischkel et al., 1995). FADD se lie ainsi par son domaine DD au domaine DD du DR et par son domaine DED au domaine DED des procaspases 8 et 10. Le DISC permet alors le clivage auto-protéolytique des procaspases 8 et 10, ce qui leur confère leur activité enzymatique et permet leur libération dans le cytoplasme (Tourneur and Chiocchia, 2010). Les caspases 8 et 10, une fois activées, peuvent activer à leur tour par

protéolyse les caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces dernières clivent alors différents substrats intracellulaires comme la lamine A, la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) ou l'ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase). Ceci conduit entre autre à la diminution de taille des cellules, à la fragmentation de l'ADN nucléaire et finalement à la mort par apoptose (Mahmood and Shukla, 2010). Les événements décrits ci-dessus sont suffisants pour induire la mort des cellules dites de type I (lymphocytes, thymocytes,...) mais sont insuffisants pour les cellules de type II (hépatocytes, cellules pancréatiques β ,...), pour lesquelles il existe un faible recrutement du DISC (Scaffidi et al., 1998) (Yin et al., 1999) (Ozören and El-Deiry, 2002) (Barnhart et al., 2003). Les cellules de type II nécessitent une voie d'amplification dépendante des mitochondries durant laquelle la caspase-8 activée conduit au clivage de la protéine pro-apoptotique BID, générant tBid (truncated Bid), qui se lie aux protéines pro-apoptotiques mitochondiales Bax et Bak et conduit à une apoptose de type intrinsèque décrite par la suite.

Le second groupe des DR, comprenant TNFR, DR3, DR6, et EDAR (EctoDysplasin A1 Receptor), recrute la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). Cette dernière peut s'associer à FADD et induire la voie d'activation des caspases 8 et 10 décrite pour Fas mais peut également faire le lien avec les protéines TRAF2 et TRAF5 (TNF Receptor Associated Factors), la kinase RIP1 (ou RIPK1, Receptor-Interacting Protein Kinase 1) et les inhibiteurs cellulaires de l'apoptose (cIAPs), formant ainsi un autre complexe de signalisation appelé le complexe I (Lavrik et al., 2005) (Mahmood and Shukla, 2010). Le complexe I s'assemble à proximité de la membrane plasmique et induit la voie des MAP kinases JNK impliquées notamment dans l'apoptose (Varfolomeev and Ashkenazi, 2004) (Symons et al., 2006). Il stimule de plus le facteur de transcription (NF- κ B), ce qui facilite la survie des cellules (Wilson et al., 2009) (Chinnaiyan et al., 1995) (Alnemri et al., 1996) (Nagata, 1997) (Ashkenazi and Dixit, 1998) (Budihardjo et al., 1999) (**Figure 32**).

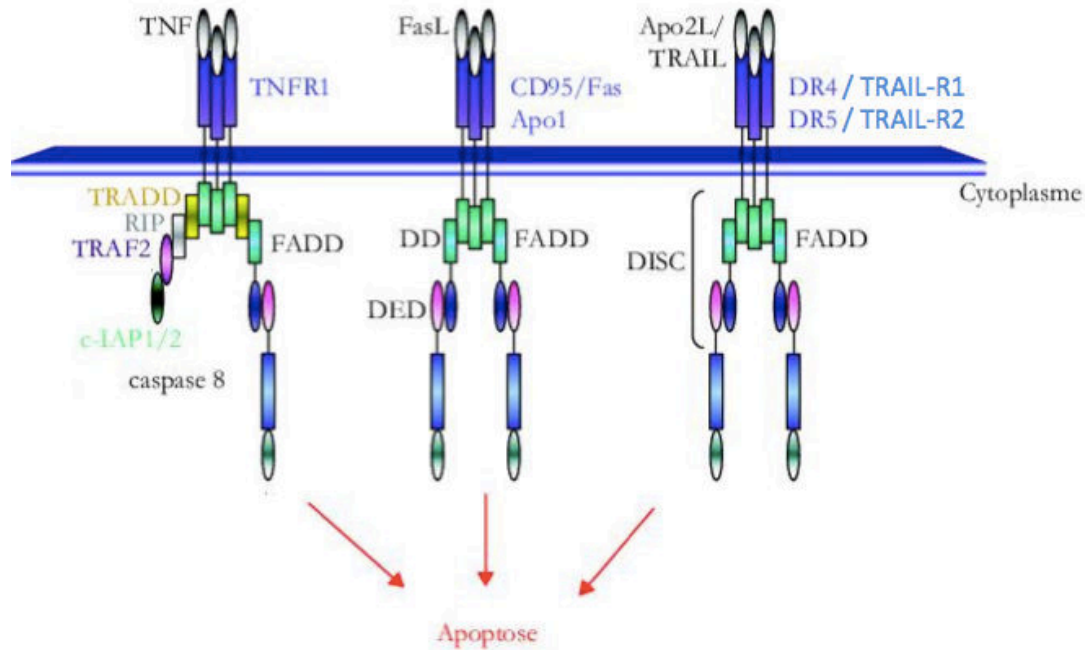


Figure 32 : Récepteurs de mort. Après fixation des ligands spécifiques, les DR se trimérisent. Les TNFR trimérisés recrutent les protéines adaptatrices TRADD et FADD dans un complexe appelé complexe I, permettant le recrutement et l'activation de la caspase 8 et l'entrée des cellules en apoptose. Par contre, les récepteurs FAS, TRAIL-R1 et TRAIL-R2 trimérisés permettent la formation d'un complexe appelé DISC, constitué de la procaspase 8 et de la protéine adaptatrice FADD, à l'origine de la signalisation apoptotique (Ségall-Bendirdjian et al., 2005).

III. 1. 4) Apoptose intrinsèque dépendante des caspases

L'apoptose intrinsèque peut être initiée par un très grand nombre de facteurs de stress, physiques ou chimiques (tels que les rayons UV, un choc thermique, un choc osmotique, un stress oxydatif ou une hypoxie), par la modification de l'expression d'oncogènes cellulaires ou de gènes suppresseurs de tumeurs (c-Myc, c-Fos, p53,...), la perturbation de structures du cytosquelette, la provocation de lésions au sein de l'ADN (à l'aide d'agents mutagènes ou cytostatiques, d'antimétabolites,...), la privation de cytokines, de facteurs de croissance et de nucléotides (ATP en particulier), ou par accumulation de protéines mal repliées. D'un point de vue moléculaire, il existe un grand nombre d'initiateurs d'apoptose mitochondriale comme, par exemple, l'augmentation du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et/ou la diminution de celui de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ou l'activation de caspase-2 initiatrice provoquée par les lésions d'ADN (Guo et al., 2002).

III. 1. 4. 1) Protéines de la famille Bcl2

Les protéines de la famille Bcl2 sont les acteurs principaux de l'évènement central de

l'apoptose intrinsèque, qui est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Elles comprennent chez les mammifères une vingtaine de membres et chaque membre comprend un ou plusieurs domaines BH (Bcl2 Homology domain) qui sont BH-1, BH-2, BH-3 et BH4. Ces BH possèdent entre eux des séquences homologues intervenant dans leurs interactions hétérodimériques. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que les processus d'homo et d'hétéro-dimérisation sont en particulier fortement influencés par les trois domaines BH-1, BH-2 et BH-3. Deux sous classes sont distinguées pour les membres de la famille Bcl2 selon leur fonction anti-apoptotique ou pro-apoptotique. Les protéines anti-apoptotiques sont Bcl2, Bcl-w, Bcl-X_L, A1 (aussi connue sous le nom de Bcl-2A1) et Mcl-1. Leur localisation initiale est différente : les Bcl2 sont présents au niveau de la membrane mitochondriale de manière permanente, tandis que les autres protéines sont cytoplasmiques et ne se positionnent au niveau de la mitochondrie qu'après activation, suite à un stimulus apoptotique. Ces protéines possèdent les 4 domaines BH, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal hydrophobe. Ce dernier est responsable de leur localisation au niveau de la membrane externe mitochondriale. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-groupes : un de type Bax/Bak et un autre formé de protéines ne possédant que le domaine BH3. Le premier sous groupe comprend les protéines dites effectrices, qui sont responsables de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bok). Ces protéines possèdent les 4 domaines BH à l'exception de Bcl-x_s qui ne comporte que les domaines BH3 et BH4. L'expression de Bax (Bcl-2- associated X protein) et de Bak (Bcl-2 antagonist or killer) est ubiquitaire, alors que Bok n'est retrouvée que dans les tissus associés à la reproduction (Hsu et al., 1997). Le second sous-groupe, ne possédant que le domaine BH3 (Bcl2 Homology domain 3), comprend Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa, Puma/Bbc3 et Hrk/DP5. Ces protéines interviennent dans l'initiation du phénomène apoptotique. Ils permettent de relier le signal apoptotique aux protéines effectrices en particulier Bax et Bak. Des études menées sur des souris génétiquement modifiées (transgéniques ou knock-out) ainsi que des observations réalisées à partir de tumeurs humaines ont montré que l'oncogenèse peut être associée à un gain de fonction des protéines anti-apoptotiques (surexpression de Bcl- 2 par exemple) ou à une perte de fonction des activateurs de la mort cellulaire par apoptose (perte de Bim par exemple). Bcl2 est surexprimée chez les lymphocytes B dans le cas des lymphomes folliculaires suite à une translocation chromosomique t(14; 18), dans les LLC (leucémie lymphoïde chronique) et dans le cas de certaines tumeurs solides (cerveau, sein, poumon) (Kitada et al., 1998) (Tsujimoto et al., 1985) (Tsujimoto et al., 1984) (Castle et al., 1993). La surexpression de Bcl-2 dans la

LLC et de nombreux autres cancers a été attribuée à l'hypo-méthylation du promoteur du gène ou à une perte des micro-ARN 15-a et 16-1 (régulateurs négatifs de l'expression) (Kitada et al., 1998) (Cimmino et al., 2005). D'autres protéines anti-apoptotiques ont également été retrouvées comme étant surexprimées dans différents types de cancers. Bcl-X_L et Mcl-1 sont surexprimées dans le myélome multiple et Mcl-1 dans la leucémie myéloïde aigue (**Figure 33**).

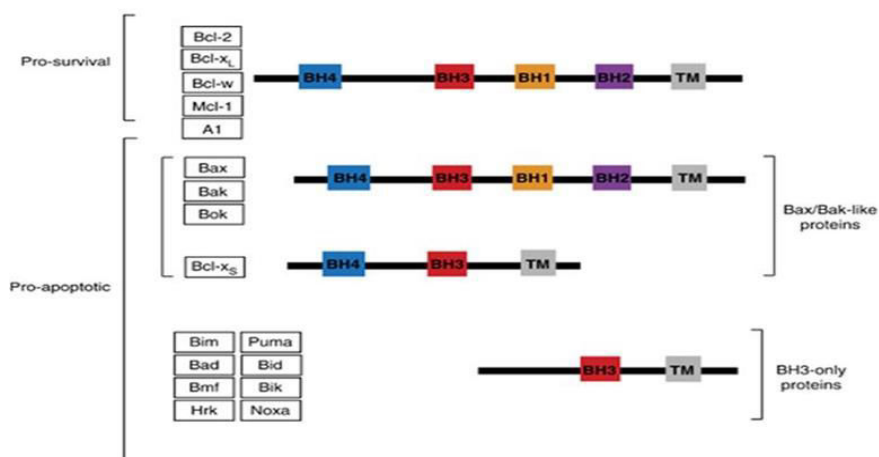


Figure 33 : Structure des molécules de la famille Bcl2. On distingue les molécules de la famille Bcl2 de type pro-survie ou pro-apoptotiques. Parmi les molécules pro-apoptotiques, certaines comportent les 4 domaines BH1, 2, 3 et 4 (Bcl2 Homology Domain), BH1 et 4 ou seulement BH3. BH: Bcl2 Homology domain. TM: domaine transmembranaire (modifié d'après Kelly and Strasser, 2011).

III. 1. 4. 2) Perméabilisation de la membrane mitochondriale et apoptosome

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale met en jeu des interactions entre protéines de type pro-apoptotiques mais elle est empêchée par les interactions entre protéines anti-apoptotiques ou entre protéines anti et pro-apoptotiques (tel que le dimère Bcl2/Bax). L'activation de Bax ou de Bak, parmi les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 joue un rôle essentiel. En leur absence, l'apoptose ne peut avoir lieu, quel que soit le stimulus (Wei et al., 2001). Ces 2 protéines Bax et Bak peuvent être activées par interaction avec les protéines pro-apoptotiques, Bim (Bcl-2-Interacting Mediator of cell death) ou Bid à domaine BH3. Bim et Bid peuvent elles-même être activées en amont par la voie JNK (phosphorylation de Bim ou clivage de Bid) (Lovell et al., 2008). Lorsqu'elles sont activées, Bax et Bak subissent d'importants changements conformationnels, conduisant à l'étape clé de la perméabilisation membranaire mitochondriale qui est leur oligomérisation au niveau de la

membrane mitochondriale (Hsu et al., 1997) (Eskes et al., 2000) (Wei et al., 2000). En effet, l'activation de ces protéines insérées au sein de la mitochondrie, conduit à l'exposition de leur domaine BH3 qui s'insère alors dans la poche hydrophobe d'une molécule de Bax ou de Bak adjacente. Il y a alors formation de dimères symétriques ou asymétriques (Bax/Bax, Bak/Bak ou Bax/Bak) puis d'oligomères de ces protéines. Le nombre exact de dimères déclenchant le processus de perméabilisation n'est pas encore défini. Bien qu'une étude ait montré que 4 molécules de Bax sont suffisantes pour déclencher la perméabilisation sur membrane artificielle, une autre étude a montré que cette perméabilisation nécessite la présence d'un nombre plus important d'oligomères de Bax que d'oligomères de Bak (Saito et al., 2000) (Nechushtan et al., 2001) (**Figure 34A**). Des mutations sur Bax et Bak empêchent la formation d'oligomères et la perméabilisation de la membrane mitochondriale (George et al., 2007) (Dewson et al., 2008). D'autres part, les similitudes structurelles de Bax et Bak avec des toxines bactériennes capables de former des pores membranaires ont conduit à l'hypothèse selon laquelle ces protéines sont directement à l'origine de la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe (Suzuki et al., 2000). Il a été montré que les dimères de Bax ou de Bak forment tout d'abord des pores de petite taille qui s'associent avec d'autres dimères, pour aboutir à la formation de canaux de grande taille (pores lipidiques appelés également micelles inversées) qui sont nécessaires à la sortie du cytochrome c de l'espace inter-membranaire. L'inhibition de la formation de canaux de grande taille bloque le processus d'apoptose (**Figure 34B**). Le cytochrome c libéré après perméabilisation de la membrane externe mitochondriale s'associe dans le cytoplasme à la protéine adaptatrice Apaf-1, en présence d'ATP ou de dATP (Kim et al., 2005) (Willis and Adams, 2005) (Johnstone et al., 2008). Ceci conduit, suite à l'hydrolyse de l'ATP/dATP en ADP/dADP, au changement conformationnel et à l'oligomérisation d'Apaf-1, aboutissant à la formation d'un complexe heptamérique (en forme de roue) dit apoptosome (**Figure 34C**). Ce dernier recrute la procaspase 9 et l'active par dimérisation. Une fois activée, la caspase 9 va à son tour activer les caspase 3, 6 et 7 (Mahmood and Shukla, 2010). SMAC/DIABLO est également libérée de la mitochondrie et facilite l'apoptose en inhibant les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Du et al., 2000). L'AIF (Apoptosis Inducing Factor), qui conduit à la condensation de la chromatine et à la dégradation de l'ADN, ainsi que l'endonucléase G (DNase associée à l'apoptose) sont également libérées de la mitochondrie (Du et al., 2000) (Li et al., 2001). Le niveau d'expression et la phosphorylation de la caspase 9 sont des facteurs importants dans la fonctionnalité de l'apoptosome. Différentes kinases, impliquées dans la survie et la prolifération, telles que Erk1 (également connu sous le nom de MAPK3 ou Mitogen Activated

Protein Kinase 3) et Erk2/MAPK1, ou dans la progression du cycle cellulaire, comme CDK1 (cyclin- dépendent kinase 1), conduisent à la phosphorylation de la pro-caspase 9, ce qui inhibe son activité enzymatique et empêche son activation par dimérisation au sein de l'apoptosome. Le principal site de phosphorylation inhibitrice de la caspase 9 humaine est La Thréonine 125 (Allan et al., 2003) (Allan and Clarke, 2007) (Allan and Clarke, 2009). Par contre, la PCID1 (PCI domain-containing protein 1), également connue sous le nom de tango7 ou Eif3m (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M), régule positivement le niveau d'expression de la procaspase 9, ce qui contribue à augmenter le niveau d'expression de la caspase 9 activée et induit par la suite le processus d'apoptose (**Figure 34C**).

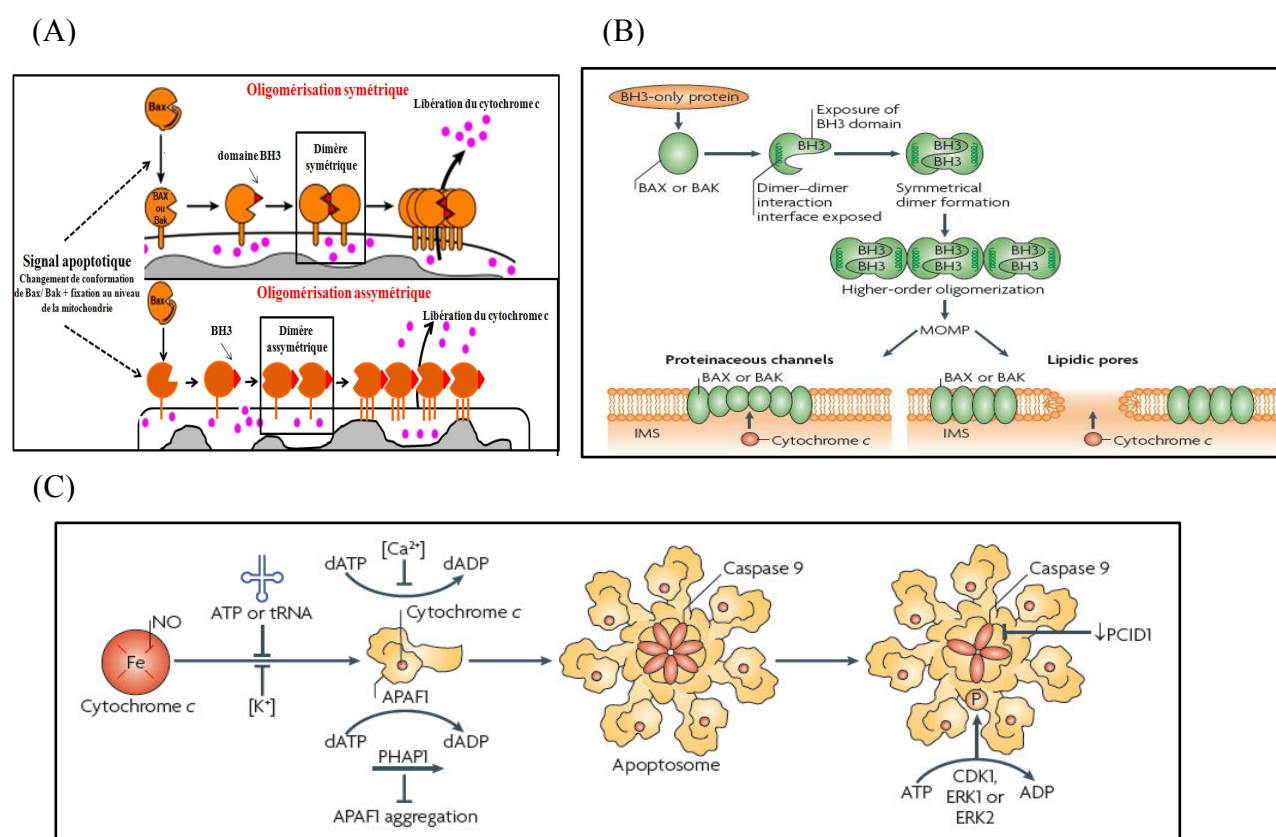


Figure 34 : Schématisation de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par Bax et Bak et de la formation de l'apoptosome. (A) Assemblage des dimères de Bak au sein de la membrane externe mitochondriale, (B) Formation des pores lipidiques dans la membrane mitochondriale par association de Bax et bak, (C) Formation de l'apoptosome permettant l'activation de la procaspase 9 par son association à 7 molécules d'APAF-1. CDK1: Cyclin-dependent kinase 1. ATP: adénosine-5'-triphosphate. ADP: adénosine diphosphate. PHAP1: Putatif HLADR-Associated Protein I. PCID1: PCI domain-containing protein 1 (d'après Tait and Green, 2010).

III. 1. 4. 3) Réticulum endoplasmique et apoptose intrinsèque

Bax et Bak jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'apoptose mitochondriale, mais peuvent également se localiser au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La réponse au stress de ce dernier induit des changements conformationnels de Bax et Bak et leur oligomérisation, la perméabilisation de la membrane du RE et la libération de calcium. Une absorption accrue de Ca^{2+} par la mitochondrie est induite suite à l'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique (Scorrano et al., 2003) (Zong et al., 2003) et la production de ROS est par la suite stimulée, ce qui conduit à l'ouverture des pores de transition mitochondriaux (MPT, Mitochondrial Pore Transition). Une diminution dramatique du potentiel transmembranaire de la membrane interne mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) se produit alors. Ceci conduit à un gonflement de la matrice intermembranaire et à la libération des médiateurs pro-apoptotiques (Brookes et al., 2004) (Petrosillo et al., 2004).

Le stress du RE peut jouer un rôle central dans la transmission de certains stimuli pro-apoptotiques. Il peut-être un événement important dans différentes pathologies (telles que les accidents vasculaires cérébraux ou les troubles neurodégénératifs) présentant des phénomènes de perte d'homéostasie du RE associés à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et des ROS. Il peut être associé au dysfonctionnement mitochondrial pouvant conduire à une apoptose intrinsèque (Rao and Bredesen, 2004) (Verkhatsky and Toescu, 2003).

III. 1. 5) Caspases

Les caspases jouent un rôle important dans l'initiation et l'exécution du processus d'apoptose, ainsi que dans celui de l'inflammation. Des anomalies dans leur activité peuvent être à l'origine du développement de tumeurs ou du déclenchement de maladies auto-immunes (S Ghavami, 2009) (Green et al., 2009). Il s'agit de cystéines protéases qui clivent leurs substrats après le résidu aspartate (Caspase : capacité à cliver après l'acide aspartique). Chez les mammifères, il existe 14 caspases différentes classées en trois groupes selon leur fonction (**Tableau 8**). Le groupe initiateur de l'apoptose (groupe I) comporte les caspases 2, 8, 9, et 10. Le groupe effecteur de l'apoptose (groupe II) comporte les caspases 3, 6 et 7. Le groupe III impliqué dans l'activation des cytokines comporte les caspases inflammatoires 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14. Les caspases initiatrices 2 et 9 interviennent dans le cas de l'apoptose intrinsèque et les caspases initiatrices 8 et 10 dans le cas de l'apoptose extrinsèque. Les caspases effectrices 3, 6 et 7 interviennent dans les deux types d'apoptose. De même, les caspases de

groupe III, excepté la caspase 14, peuvent également être considérées comme ayant des effets de type apoptotique. Elles induisent une forme de mort programmée due à une activation massive des cellules inflammatoires associée à une réponse antimicrobienne dite la pyroptosis (Labbé and Saleh, 2008). La seule caspase sans aucun effet apoptotique est la caspase 14, qui intervient par ailleurs dans la différenciation kératinocytaire (Denecker et al., 2007).

Tableau 8 : Les trois groupes de caspases initiatrices, effectrices et inflammatoires (d'après Rastogi et al., 2009).

Cysteiny aspartic acid-protease (caspase)		
Type	name	synonyms
Initiator (or Apical)	Caspase-2	ICH1, Nedd2
	Caspase-8	FLICE, MACH1, MCH5, FADD-like Ice
	Caspase-9	MCH6, ICELAP6
	Caspase-10	FLICE2, MCH4
Effectors (or executioner)	Caspase-3	CPP32, YAMA
	Caspase-6	MCH2
	Caspase-7	MCH3, CMH, ICELAP3
Inflammatory	Caspase-1	ICE
	Caspase-4	ICH2, TX, ICERII
	Caspase-5	ICERIII, TY
	Caspase-11	-
	Caspase-12	-
	Caspase-13	ERICE
	Caspase-14	MICE

Les caspases possèdent un prodomaine N-terminal qui précède le domaine fonctionnel, lui-même composé d'une grande sous unité de 17-21 kDa suivi d'une petite sous unité de 10-13 kDa (Tait and Green, 2008) (Nicholson, 1999) (**Figure 35**). La grande sous-unité contient une paire (dyade) de résidus catalytiques Cystéine et Histidine, la petite sous-unité possède différents résidus permettant aux caspases de se fixer à leur substrat. Les régions non structurées qui relient le prodomaine au domaine catalytique ou les deux sous-unités du domaine fonctionnel, font souvent l'objet d'une auto-protéolyse au cours de la maturation de la protéine et contiennent des résidus aspartate. Les caspases effectrices possèdent un court prodomaine. Les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine et ainsi qu'un motif qui leur permet d'interagir physiquement avec les protéines adaptatrices, telles que FADD (pour l'apoptose extrinsèque) et Apaf-1 (pour l'apoptose intrinsèque). On peut citer le motif DED (Death effector Domain) pour les caspases 8 et 10 et le motif CARD (caspase recruitment domain) pour les caspases 1, 2, 4, et 9.

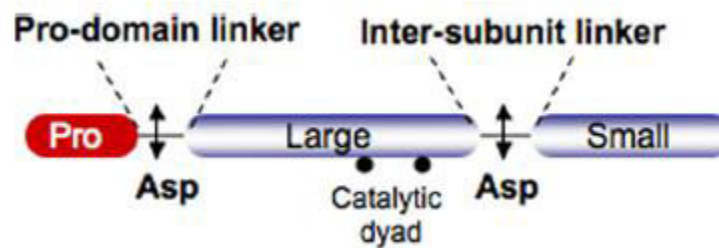


Figure 35 : Structure générale des caspases. Elles sont constituées d'un prodomaine, d'une grande et d'une petite sous-unités. Asp: asparagine. Pro: prodomaine (d'après Pop and Salvesen, 2009).

Les caspases initiateuses permettent d'activer les caspases effectrices trouvées en aval du processus apoptotique. Elles sont inactives sous forme monomériques et leur dimérisation conduit à leur autoactivation, alors que les caspases effectrices se dimérisent dans un premier temps avant d'être activées par les caspases initiateuses qui agissent en clivant les liaisons entre les différentes sous unités (**Figure 36**).

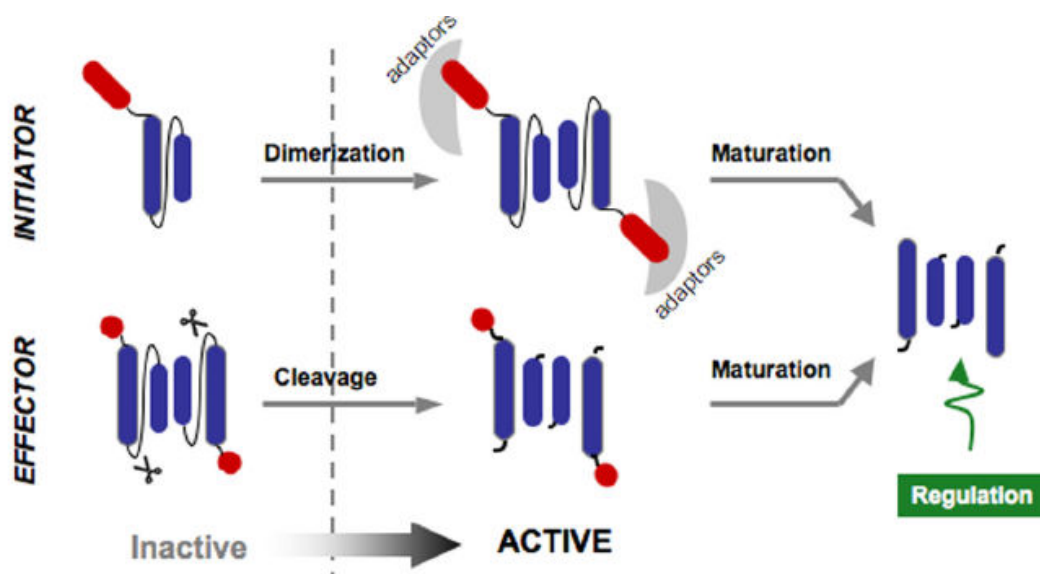


Figure 36 : Principe de l'activation des caspases initiateuses et effectrices. Les caspases initiateuses sont activées par dimérisation, alors que les caspases effectrices se dimérisent puis sont activées par les caspases initiateuses (d'après Pop and Salvesen, 2009).

III. 1. 6) Apoptose et voie P38 MAPK

Un processus complexe impliquant souvent l'activité des MAPK (Mitogen Activated Protein

kinases) permet la conversion des signaux extracellulaires en réponses intracellulaires conduisant notamment à la mort par apoptose.

Parmi les MAPK, les MAPK p38 peuvent jouer un rôle pro ou anti apoptotique, en fonction du type cellulaire et du stimulus appliqué. La surexpression de l'activateur de p38, MKK6, protège par exemple les myocytes cardiaques de l'apoptose induite par les récepteurs β -adrénergique (Zechner et al., 1998), alors que p38 peut être un médiateur important de l'apoptose pour les neurones (De Zutter and Davis, 2001) ou les cellules cardiaques (Saurin et al., 2000). Dans notre cas nous nous intéressons à l'activité pro-apoptotique de p38. Chez de nombreux types cellulaires, p38 active l'apoptose lors de la stimulation par le TNF α (Valladares et al., 2000) ou en réponse au stress oxydatif (Zhuang et al., 2000). Les kinases p38 peuvent induire l'apoptose par différents mécanismes : en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotiques ou en modulant leur activité.

La voie des MAPK p38 conduisant à l'apoptose peut être activée par les ROS. Le récepteur de mort TRAIL peut induire l'apoptose médiée par les ROS dans les cellules HeLa (Lee et al., 2002). Lors du traitement par l'acide bétulinique, les cellules de mélanomes peuvent entrer en apoptose suite à la production de ROS et à l'activation des p38 (Tan et al., 2003). L'acide salvianolique B peut également induire l'apoptose chez les cellules de glioblastomes U87 via la génération de ROS et l'activation de la voie p38 (Z.-S. Wang et al., 2013)

Les MAPK p38 peuvent de plus déclencher les voies pro-apoptotiques en régulant l'expression et/ou l'activité de différents membres de la famille Bcl-2, telles que Bax, Bim ou Bcl2. Chez les cellules dérivées de cardiomyocytes, p38 induit la surexpression de Bax aux niveaux transcriptionnel et protéique, ce qui les sensibilise à l'apoptose induite par différents stimuli (Porras et al., 2004). De plus, chez les cardiomyocytes néonataux primaires, p38 (α/β) induit la phosphorylation de Bax et sa translocation à la mitochondrie lors d'ischémie simulée (Capano and Crompton, 2006). Une translocation due à la phosphorylation de Bax par p38 (α/β) a également été observée chez une lignée d'hépatome humain (HepG2) après traitement par différents stimuli pro-apoptotiques (Kim et al., 2006), de même que chez les neurones traités par la cyanide ou l'oxyde nitrique (Shou et al., 2003). Il existe toutefois des études contradictoires. Il a par exemple été montré que p38 pouvait s'associer à Bax et le sequestrer dans le cytoplasme empêchant sa relocalisation à la membrane mitochondriale (Garibal et al., 2010)

p38 α régule positivement l'expression (Cai and Xia, 2008) et l'activité (B. Cai et al., 2006) de

Bim (molécule activatrice de Bax et Bak), ce qui contribue à l'induction de l'apoptose. Dans les cellules PC12 traitées par l'arsénite de sodium, il a été montré que p38 α stimule la transcription de Bim en induisant la translocation du facteur de transcription FOXO3 (Forhead-box O3) au noyau, conduisant également à une augmentation du niveau d'expression protéique de Bim_{EL} (une des 3 isoformes de Bim) (B. Cai and Xia 2008). P38 α contribue de plus à l'activation par phosphorylation au niveau de la Ser65 de Bim_{EL} (B. Cai et al., 2006).

P38 α peut également phosphoryler la protéine Bcl-2, ce qui conduit à l'inhibition de son activité anti-apoptotique et à la libération du cytochrome-c mitochondrial (Torcia et al., 2001).

Une étude par spectrométrie de masse a montré que Bcl2 peut être phosphorylé par p38 au niveau de la Ser87 et de la Thr56 chez les cellules B mémoires (De Chiara et al., 2006). Chez les myocytes cardiaques de rats adultes, un stress oxydatif par H₂O₂ conduit également à la phosphorylation de la protéine Bcl-2 suite à l'activation de p38 α , contribuant à l'apoptose (Markou et al., 2009).

Outre la régulation des membres de la famille Bcl2, p38 α est également impliqué dans la régulation de l'expression du récepteur pro-apoptotique Fas et de son ligand FasL. Les fibroblastes et les cardiomyocytes déficients en p38 sont plus résistants à l'apoptose, en corrélation avec une diminution de l'expression de Fas (Porras et al., 2004). Il a été montré par ailleurs que p38 participe à la surexpression de Fas et de FasL suite à une activation par l'anti-CD3 (Hsu et al., 1999). Chez les myocytes cardiaques exposés à une ischémie/reperfusion, p38 α augmente également l'expression de Fas par phosphorylation du facteur de transcription STAT1 (une cible de NF- κ B) sur la Ser-727 (Stephanou et al., 2001). P38 α peut de plus induire directement l'activation de la caspase 8 initiatrice, recrutée par les récepteurs pro-apoptotiques, tel que Fas. La présence de la molécule c-FLIP (Cellular FLICE-like inhibitory Protein) au niveau du DISC empêche l'activation de la caspase 8 (la caspase 8 en se combinant à c-FLIP à la place d'une autre caspase 8 ne peut s'autoactiver). P38 en phosphorylant c-FLIP provoque son départ du DISC (Tourian et al., 2004), ce qui permet l'activation de la caspase 8 et l'entrée des cellules en apoptose.

La protéine suppresseur de tumeur p53 est également une cible importante de p38 α . Cette dernière peut phosphoryler et/ou activer p53, en réponse à différents médicaments chimiothérapeutiques tels que la cisplatine et conduire les cellules à l'apoptose (Bragado et al.,

2007). P38 α peut de plus induire l'apoptose via p53 en réponse à d'autres stimuli, tel que l'infection par le HIV-1 (Perfettini et al., 2005). Outre son rôle de régulateur direct de p53, p38 α peut également intervenir de manière indirecte par phosphorylation et stabilisation de p18hamlet, un coactivateur de p53 (Cuadrado et al., 2007). En réponse aux dommages de l'ADN, p18Hamlet phosphorylé s'accumule dans la cellule, et favorise le recrutement de p53 au niveau du promoteur de différents gènes impliqués dans l'apoptose intrinsèque, tels que Noxa, Bax ou Bim (Zuluaga et al., 2007)

Des mécanismes associés à la progression des cellules dans le cycle ou à leur survie, peuvent également être négativement régulés par p38 α . Par exemple, la phosphorylation de l'histone H2AX par p38 α conduit à la forme γ -H2AX lors de la privation de sérum. γ -H2AX intervient dans l'arrêt des cellules dans le cycle (en particulier lors des processus de réparation d'ADN) et à leur apoptose si la forme phosphorylée est maintenue (Lu et al., 2008). P38 α est également un régulateur négatif des deux voies de survie : PI3K/Akt et ERK. Chez les cellules dérivées de cardiomyocytes ou les MEF (Mouse Embryonic Fibroblast), chez qui p38 α est déficient, les deux voies ERK et PI3K/Akt sont activées, ce qui contribue à leur survie (Porras et al., 2004 ; Zuluaga et al. 2007)

Des résultats obtenus sur des modèles physiologiques murins par invalidation de p38 montrent les fonctions antiprolifératives et suppresseur de tumeur de cette molécule, suggérant son rôle apoptotique. L'inactivation de p38 α conduit à une prolifération accrue de différents types cellulaires (cardiomyocytes, hépatocytes, cellules hématopoïétiques en particulier) (Engel et al., 2005). Des souris déficientes en p38 α et exprimant le transgène K-RasG12V développent des tumeurs au niveau des poumons (Ventura et al., 2007) ou du foie (Hui et al. 2007; Sakurai et al., 2008), ce qui montre la fonction de suppresseur de tumeur de p38 α *in vivo*. Par ailleurs, des souris déficientes en p38 δ présentent une sensibilité réduite à l'induction de cancers de la peau (Schindler et al., 2009) (**Figure 37**).

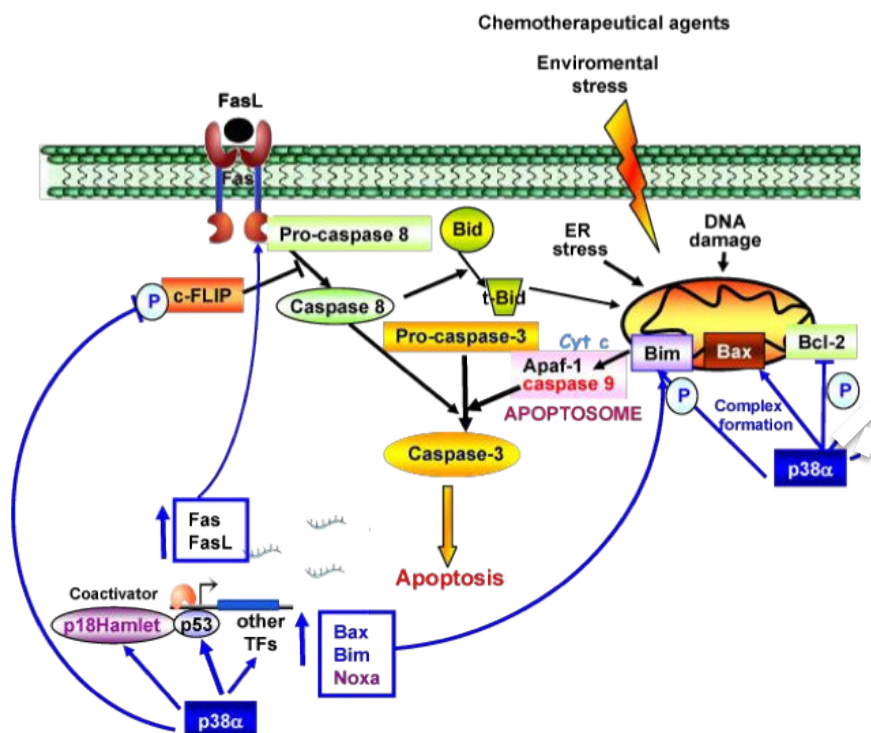


Figure 37 : Les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par p38α. L'apoptose peut être induite par activation de p38α, suite à la phosphorylation de facteurs de transcription comme p53 et/ou la surexpression de protéines proapoptotiques tels que le récepteur de mort Fas et son ligand, FasL, ou des molécules de la voie apoptotique mitochondriale, telles que celles de la famille bcl2 (Bax, Bim Noxa) et l'inactivation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Bim peut être activée par phosphorylation *via* p38α de même que Bax. Ce processus peut être accompagné de l'altération de la fonction de c-FLIP ce qui permet l'activation de la caspase 8 et la cascade des caspases. La caspase 8 peut cliver Bid et entraîner sa rélocalisation au niveau mitochondrial conduisant à une boucle d'amplification de l'apoptose (Porras and Guerrero, 2010).

III. 2) Voies de signalisation impliquée dans l'apoptose induite par les HDACi

L'acétylation des histones et l'inhibition de l'expression des gènes induits par le traitement des cellules tumorales avec les HDACi augmente leur sensibilité à l'apoptose. L'induction de l'apoptose semble être la principale voie de mort cellulaire induite par les HDACi (Frew et al., 2009), ce qui représente une valeur thérapeutique considérable pour le traitement des cancers (Marks and Xu, 2009). Selon le type cellulaire, les HDACi peuvent induire la mort des cellules tumorales par apoptose, *via* la voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort) ou *via* la voie intrinsèque (voie mitochondriale) (Zhang and Zhong, 2014).

III. 2. 1) Voie extrinsèque

Les HDACi permettent d'augmenter la signalisation par la voie de l'apoptose extrinsèque selon divers mécanismes, dont la régulation positive de l'expression des récepteurs de mort TRAIL R à la surface cellulaire et/ou de leurs ligands (TRAIL), la réduction du niveau d'expression cytoplasmique de protéines inhibitrices de l'apoptose de type FLICE (c-FLIP) intervenant dans l'inhibition de la formation du DISC. Parmi ces mécanismes, les effets le plus fréquemment rapportés sont une sensibilisation à l'apoptose de nombreux types de cellules tumorales par les voies TRAIL-R/TRAIL. Il a été observé que les HDACi induisent une augmentation de l'expression du récepteur de mort TRAIL-R2, associé à une diminution de l'expression de c-FLIP chez de nombreuses cellules malignes humaines (Lagneaux et al., 2007) (Carlisi et al., 2009) (VanOosten et al., 2005). Ceci conduit, en présence de TRAIL, à la mise en place rapide du DISC et à l'activation de la caspase-8. Les HDACi peuvent sensibiliser les cellules à l'apoptose lors de l'utilisation de TRAIL recombinant (signalisation TRAIL-R/TRAIL), comme cela a été montré dans le cas de cellules de carcinome hépatocellulaire et de cellules leucémiques humaines. Les HDACi peuvent induire l'expression de TRAIL en activant directement le promoteur du gène TNFS10, ce qui a par exemple permis de déclencher la signalisation de la mort par apoptose de cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM) (Nebbioso et al., 2005).

Par ailleurs, les HDACi facilitent le recrutement de FADD et de la caspase-8 formant le complexe actif du DISC. Dans le cas de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) naturellement résistantes à l'apoptose induite par TRAIL, l'HDACi FK228, est capable d'induire l'apoptose à de faibles concentrations par sensibilisation en facilitant la formation de DISC actifs et en conduisant à l'activation rapide de la pro-caspase-8 (Inoue et al., 2004). Il est intéressant de noter que les HDACi de type depsipeptides ne renforcent pas la liaison de TRAIL/TRAIL-R1, l'agrégation ou l'internalisation du récepteur TRAIL-R1 et n'améliorent pas le recrutement de FADD à TRAIL R1 dans le DISC (Inoue et al., 2009).

L'importance fonctionnelle de la voie extrinsèque de la mort cellulaire induite par les HDACi a été étudiée grâce au mécanisme d'ARN interference (RNAi) ou de KO de la voie TRAIL-R/TRAIL. Dans les cellules issues de LAM, l'utilisation de RNAi conduisant à l'inhibition de l'expression transcriptionnelle de TRAIL bloque l'activation en aval de la procaspase-8 et inhibe l'apoptose médiée par l'HDACi MS275, ce qui contribue à penser que TRAIL intervient dans l'action anticancéreuse des HDACi (Nebbioso et al., 2005). Cependant, des

études réalisées *in vivo* avec le modèle de lymphome Eμ-myc montrent que le blocage par KO de la voie des TRAIL n'a pas d'effet sur les activités thérapeutiques des HDACi LAQ824 et LBH589 (Ellis et al., 2009). Par conséquent, il est possible que l'importance de la voie extrinsèque de l'apoptose induite par les HDACi dépende du type cellulaire.

III. 2. 2) Voie intrinsèque

En plus d'agir par la voie extrinsèque des récepteurs de mort, les HDACi peuvent également induire l'apoptose chez de nombreux types de cellules cancéreuses suite à l'activation de la voie intrinsèque mitochondriale. Ceci peut avoir lieu suite à une modification de l'expression de molécules de la famille Bcl2, telle qu'une diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X_L et/ou une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak (Gillenwater et al., 2007) (Iacomino et al., 2008) (Bai et al., 2011). Par exemple, le traitement par l'HDACi TSA réprime la transcription et régule négativement l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et Bcl-X_L dans des cellules de myélome résistantes à l'apoptose par TRAIL, ce qui les sensibilise à l'apoptose (Fandy and Srivastava, 2006). Une diminution significative de l'expression de la protéine Bcl-X_L a également été observée suite à l'exposition au butyrate de sodium dans le mésothéliome (cancer de la membrane recouvrant et protégeant la plupart des organes : le mésothélium), et cela a été corrélé à une diminution de la transcription des ARNm de Bcl-X_L (Cao et al., 2001). Ces études suggèrent que la diminution de l'expression des gènes de la famille des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 peut être un élément déclencheur de l'apoptose induite par les HDACi. La baisse d'expression des protéines de la famille anti-apoptotiques Bcl-2 sensibilise d'autant plus les cellules à l'activité cytotoxique des HDACi. A l'opposé, la sur-expression des protéines de la famille Bcl-2 peut contrecarrer l'apoptose induite par les HDACi, comme cela a été montré chez de nombreuses lignées de cellules cancéreuses, telles que les cellules B humaines ou les cellules de mélanomes (Mitsiades et al., 2003) (Peart et al., 2003) (Armeanu et al., 2005) (Shao et al., 2010). Par ailleurs, des études réalisées *in vivo* sur le modèle de lymphome Eμ-myc a montré que la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-X_L protège de la mort induite par les HDACi (Lindemann et al., 2007) (Ellis et al., 2009).

Les travaux de nombreuses équipes montrent que les HDACi peuvent conduire à une augmentation de l'expression de protéines très variées de la famille proapoptotique Bcl2 telles que Bim, Bmf, Bad, Bid, Noxa, Puma, Bax et Bak. Ceci a pu être démontré chez différents types de cellules tumorales avec des augmentations du niveau de transcription des gènes et/ou

des régulations positives au niveau post-transcriptionnel (Zhao et al., 2005) (Xu et al., 2006) (Matthews et al., 2012). Il a été démontré que l'activation de la transcription de Bim, Bmf, Noxa, et Puma, suite au traitement par les HDACi, peut être due à l'hyperacétylation des histones H3 et/ou H4 dans leurs régions promotrices (Wiegman et al., 2011) (Xargay-Torrent et al., 2011). L'importance fonctionnelle des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans l'apoptose médiée par les HDACi a été largement étudiée. L'inhibition transcriptionnelle de Bim à l'aide de siRNA inhibe efficacement la mort cellulaire due à une sensibilisation par les HDACi et médiée par E2F1 (Zhao et al., 2005). Un rôle essentiel a été proposé à la fois pour Bim et pour Noxa dans le cas de l'apoptose médiée par les HDACi. Ceci résulte de la constatation selon laquelle les siARN dirigés contre Bim et Noxa contrecarrent en grande partie la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial induite par les HDACi et l'activation des caspases (Donadelli et al., 2007) (Inoue et al., 2007). Des études *in vivo* suggèrent également que Bim joue un rôle central dans la médiation des effets apoptotiques du vorinostat (Lindemann et al., 2007). Ce dernier induit spécifiquement l'expression des ARNm de Bim chez des souris porteuses de lymphomes Eμ-myc ; le knock-out de Bim chez ces mêmes souris conduit à l'inhibition de l'apoptose induite par le vorinostat. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, l'inhibition de l'expression de Bim conduit à la suppression des effets thérapeutiques du vorinostat.

En plus de la voie de mort extrinsèque, les TRAIL-R peuvent également activer la voie intrinsèque. L'exposition simultanée de cellules leucémiques à TRAIL et au vorinostat se traduit par une augmentation importante des dommages mitochondriaux, conduisant à l'activation des caspases et à l'apoptose (Rosato et al., 2003a). Ces phénomènes sont significativement diminués si on emploie des inhibiteurs de la voie extrinsèque de l'apoptose (dominant négatif de la caspase-8, dominant négatif de FADD, CrmA) ou de la voie intrinsèque (inhibiteurs de Bcl-2 ou de Bcl-X_L). Ceci indique que les voies extrinsèques et intrinsèques sont simultanément activées. La voie intrinsèque peut être activée suite au clivage de Bid par la caspase 8. Bid servant de lien moléculaire entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La molécule clivée tBid peut aller à la membrane mitochondriale et initier l'apoptose ce qui permet d'amplifier l'effet apoptotique.

Outre les voies classiques caspase-dépendantes, il est connu que d'autres protéines proapoptotiques mitochondriales telles que AIF peuvent être libérées par les mitochondries et induire le processus d'apoptose (Susin et al., 1999). Fandy et al ont mis en évidence la libération d'AIF dans le cytosol et son transfert au noyau suite au traitement du myélome

multiple par le vorinostat ou le TSA (Fandy et al., 2005). La libération d'AIF dans le cytosol a également été observée lors du traitement de cellules leucémiques humaines par les HDACi MS-275 et LAQ824 (Guo et al., 2004) (Maggio et al., 2004).

III. 2. 3) Mécanismes alternatifs de la mort par apoptose

Les mécanismes moléculaires par lesquels les HDACi induisent la mort cellulaire ne sont pas totalement élucidés. De nombreux processus sont partagés par la majorité des HDACi mais les mécanismes d'action précis semblent propres à chaque molécule. Ceux impliquant la régulation de l'apoptose sont présentés ci-après.

III. 2. 3. 1) Substrats des HDACi

Il a été démontré que l'acétylation de protéines non histones peut moduler leur fonction par modification de leur stabilité, de leur localisation cellulaire, et de leurs interactions protéine/nucléotide ou protéine/protéine. D'une manière intéressante, de nombreuses protéines non-histones modifiées par acétylation sont importantes pour la tumorigenèse, la prolifération des cellules cancéreuses, la mort cellulaire ou les fonctions immunitaires. Ces dernières sont décrites ci-après.

- **NF- κ B.** Il est actuellement clairement établi que NF- κ B est un régulateur clé de l'expression transcriptionnelle de protéines intervenant dans la réponse inflammatoire, et possédant un effet anti-apoptotique. Chez les mammifères, NF- κ B fonctionne comme un ensemble d'homodimères ou d'hétérodimères générés à partir de cinq protéines de la famille Rel (RelA, c-Rel, RelB, p50 et p52), qui partagent de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles. RelA et p50 interviennent dans la voie dite canonique de NF- κ B qui joue un rôle important dans le contrôle de l'inflammation. L'inactivation de NF- κ B se fait par association de ces dimères à la protéine inhibitrice I κ B α , ce qui empêche son transport dans le noyau et interfère dans sa liaison à l'ADN (Rodriguez et al., 1999). En réponse à des stimuli inflammatoires, I κ B α est phosphorylée, ubiquitinée et dégradée. Sa dégradation permet la libération et la translocation du facteur de transcription NF- κ B au noyau, permettant la transcription des gènes cibles.

Différentes études ont montré que l'activité des HDAC est requise pour l'initiation et/ou une transcription efficace des gènes pro-inflammatoires induite par NF- κ B. L'inhibition de l'activation de NF- κ B contribue, du moins partiellement, à potentialiser l'activité antitumorale des HDACi comme cela a été démontré pour différentes lignées

de cellules cancéreuses (Yao et al., 2006) (Chen et al., 2007) (Kaler et al., 2008) (Grabiec et al., 2010). Certains travaux montrent cependant que l'HDAC3 permet la désacétylation des formes acétylées de RelA favorisant sa liaison à I κ B α et contribue à l'arrêt de la réponse de NF- κ B. En effet, la sous-unité RelA de NF- κ B est soumise à une acétylation inductible qui empêche son interaction avec I κ B α . La désacétylation par HDAC3 permet cette interaction et conduit à l'export du complexe NF- κ B/ I κ B α du noyau ce qui permet de contrôler la durée de la réponse transcriptionnelle de NF- κ B (Chen Lf et al., 2001) (Chen and Greene, 2003). L'inhibition de HDAC3 par l'HDACi TSA conduit par conséquent à une activation prolongée de NF- κ B et à une augmentation de la réponse pro-inflammatoire. Ceci est vrai pour différentes HDACi (Chen and Greene, 2003) (Kim et al., 2006) (Zhu et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que lors du traitement par les HDACi, NF- κ B peut jouer un rôle cytoprotecteur ou cytotoxique, selon la nature, la concentration et/ou le temps d'exposition aux HDACi, ou selon le type cellulaire considéré (Zhang and Zhong, 2014).

- **P53.** p53 est une protéine suppresseur des tumeurs souvent inactivée ou mutée dans les cancers. En réponse aux stress tels que les dommages de l'ADN, p53 s'accumule dans le noyau suite à sa dissociation de l'ubiquitine ligase E3 Mdm2, ce qui lui permet d'activer différents gènes cibles, y compris *p21*. p21 est un inhibiteur de cdk (kinase dépendante de la cycline) conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'activation de gènes proapoptotiques tels que Bax, Puma et NOXA (Shieh et al., 1997) (Lakin and Jackson, 1999) (Li et al., 2002) (Feng et al., 2005) (Menendez et al., 2009) (Beckerman and Prives, 2010). Le stress induit différentes modifications permettant d'activer p53. Il s'agit de phosphorylations par des kinases (telles que ATM, CHK1, CHK2), et d'acétylations/désacétylations contrôlées par les acétyltransférases tels que CBP/p300 et les désacétylases, dont le complexe HDAC1 / mSin3 et Sirt1 (Gu and Roeder, 1997) (Luo et al., 2000) (Vaziri et al., 2001).

Le rôle de l'acétylation de p53 dans l'apoptose médié par les HDACi est controversé. La plupart des travaux montrent que l'apoptose et l'induction de p21, suite à l'inhibition des HDAC, peuvent être induites de manière indépendante de p53 (Sowa et al., 1999) (Vrana et al., 1999) (Gui et al., 2004). Par ailleurs, suite à l'inhibition des HDAC, il a été rapporté pour plusieurs types de tumeurs que l'acétylation de p53 pouvait être liée à la stabilisation de p53, à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose

(Roy et al., 2005) (Kawano et al., 2010) (Hsu et al., 2011). Plus récemment, des études ont montré que l'HDACi TSA induit l'apoptose suite à l'expression de PUMA qui est une molécule de la famille proapoptotique Bcl2, dans les cellules cancéreuses de l'estomac, et ce par l'intermédiaire de deux voies indépendantes : la stabilisation de p53 et l'interaction de p53 avec le promoteur de PUMA, par inhibition de HDAC3 (Feng et al., 2013).

- **STAT1.** STAT1 est connu pour réprimer la signalisation cellulaire médiée par NF- κ B (Suk et al., 2001). Il peut interagir avec des HATs et des HDACs (Nusinzon and Horvath, 2003). Il a été montré que dans des lignées cellulaires de mélanome humain entrant en apoptose en réponse à l'interféron α et à un HDACi, il existe une augmentation de l'expression et une acétylation de STAT1. L'acétylation de STAT1 fonctionne comme un commutateur moléculaire, permettant sa liaison à NF- κ B, ce qui interfère avec la fonction de ce dernier en empêchant sa liaison à l'ADN, sa localisation nucléaire et l'expression de gènes anti-apoptotiques et conduit à l'apoptose (Krämer et al., 2006).
- **Tubuline.** Les microtubules stables contiennent des niveaux élevés d' α -tubuline acétylée, tandis que les microtubules dynamiques sont largement hypoacétylés. Les HDAC6 et les Sirt2 sont en mesure de désacétyler l' α -tubuline et de contrôler le niveau d'acétylation de la tubuline et l'assemblage du réseau de microtubules (North et al., 2003) (Hubbert et al., 2002). Dans le traitement combiné par le TSA et le paclitaxel, une augmentation significative de la stabilisation de la tubuline et de l'acétylation des microtubules a été observée, ce qui conduit à l'activation de la cascade apoptotique dans les cellules de cancer de l'endomètre. Les données *in vivo* chez un modèle de souris suggèrent également que l'acétylation de l' α -tubuline est un mécanisme possible par lequel les HDACi réduisent le développement des cancers (Dowdy et al., 2006).
- **P38.** La voie de signalisation de la MAP kinase (MAPK) p38 est impliquée dans de nombreux processus physiologiques. Elle est essentielle pour l'induction et le maintien de l'inflammation chronique. De même que le NF- κ B, elle contribue à la régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et des événements de signalisation conduisant à l'inflammation des articulations et à leur destruction dans le cas de la

polyarthrite rhumatoïde (RA). Par conséquent, la voie de la MAPK p38 a été identifiée comme une cible thérapeutique moléculaire potentielle. L'équipe de Choo *et al.* (2013) a évalué l'impact du MS-275 et du SAHA sur la lignée E11 de fibroblastes synoviaux humains. Ils ont pu démontrer que les deux HDACi suppriment de manière significative l'expression de p38 α , tout en induisant celle de MKP-1 (MAPK phosphatase-1), qui est une phosphatase ayant pour substrat p38 α . Par conséquent, la diminution d'expression de p38 α s'accompagne de son inhibition par déphosphorylation (Choo *et al.*, 2013).

III. 2. 3. 2) Espèces oxygénées réactives

L'accumulation de ROS (Reactive oxygen species) a lieu dans les cellules transformées traitées par les HDACi, tels que le vorinostat, le TSA, le MS275, ou le LAQ824 (Rosato *et al.*, 2003b) (Marks, 2006) (Rosato *et al.*, 2006). L'exposition de cellules leucémiques humaines à une concentration plus élevée de LAQ824 a abouti à la production de ROS en amont de la perturbation des mitochondries, impliquant un stress oxydatif accru (Ruefli *et al.*, 2001). Le pré-traitement avec des molécules piégeant les ROS (ROS scavengers) telle que la N-acétyl cystéine (NAC) réduit l'apoptose induite par les HDACi ce qui suggère que le stress oxydatif peut jouer un rôle important dans la mort des cellules tumorales dont ils sont à l'origine (Ruefli *et al.*, 2001) (Yu *et al.*, 2007a) (Yoshioka *et al.*, 2013). D'autres études montrent que la production accrue de ROS, induit l'apoptose de manière synergique avec un cotraitement par un HDACi (Yu *et al.*, 2007a) (Yoshioka *et al.*, 2013). Rosato *et al.* (2008) ont par exemple démontré un effet synergique du traitement par un médicament chimiothérapeutique, la fludarabine avec le LAQ824 sur l'induction de l'apoptose dans des cellules leucémiques humaines. Ils ont observé un pic précoce de ROS lors du traitement par des HDACi, et montré que l'utilisation simultanée de NAC diminue la létalité induite par LAQ824/fludarabine, suggérant que l'induction de ROS médiée par les HDACi est une cause plutôt qu'une conséquence de l'effet synergique observé.

L'homéostasie cellulaire redox est maintenue grâce à un ensemble complexe de réactions. Les membres de la famille thiorédoxine (Trx) fonctionnent comme des donneurs d'hydrogène et de puissants « scavengers » de ROS, participant à ce processus. Le traitement par les HDACi résulte en une expression accrue de la protéine de liaison Trx 2 (TBP2), qui se lie à Trx et inhibe son activité (Butler *et al.*, 2002) (Xu *et al.*, 2006), ce qui peut provoquer une régulation négative de Trx dans les cellules transformées, contrairement aux cellules normales. Par

ailleurs, le RNH1, un inhibiteur de la ribonucléase, a été montré comme réduisant l'induction de ROS par les HDACi dans des cellules de cancer gastrique. Les tests de knockdown ou de surexpression de RNH1 indiquent qu'il est à la fois nécessaire et suffisant pour induire la résistance aux HDACi. RNH1 a été identifié comme un régulateur de la résistance aux HDACi dans le cancer gastrique, mettant en évidence un rôle fonctionnel de l'induction des ROS dans les effets des HDACi (Zhu et al., 2014).

Le stress oxydatif peut favoriser l'apoptose suite à l'augmentation de la régulation de protéines pro-apoptotiques et/ou suite à l'activation de la voie apoptotique extrinsèque. Il a été démontré que la production de ROS est au centre de l'induction de la mort cellulaire induite par le SAHA, résultant du clivage de Bid, molécule proapoptotique à domaine BH3 de la famille Bcl2 (Ruefli et al., 2001). L'augmentation synergique de l'apoptose suite au traitement combiné avec un HDACi et un inhibiteur de la PI3K (le LY294002) a été montrée comme résultant de l'accumulation intracellulaire de ROS et l'induction de l'expression de Bim. Dans des cellules de LAM (leucémie aigue myéloïde) humaines, l'effet synergique des HDACi et du resvératrol est associé à la production soutenue de ROS et le traitement avec le « scavenger » MnTBAP (Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin) conduit à une diminution des ROS, de l'expression de DR5, de l'activation de caspase-8, des lésions de l'ADN, et par voie de conséquence de l'apoptose. Ceci indique le rôle primordial des dommages oxydatifs dans la mort des cellules de LAM co-traités par les HDACi et le resvératrol. Ceci nécessite plusieurs processus dépendants des ROS, dont l'augmentation de l'expression de TRAIL-R, l'activation de la voie apoptotique extrinsèque, et l'induction des dommages de l'ADN (Yaseen et al., 2012).

III. 2. 3. 3) p21, régulateur du cycle cellulaire

Les HDACi peuvent induire simultanément l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il a clairement été montré que l'expression accrue de p21 est une réponse moléculaire commune aux HDACi. L'expression accrue de p21 a également été corrélée avec les voies dépendantes et indépendantes de p53 (Vrana et al., 1999) (Richon et al., 2000). Il a été proposé que p21 peut influencer l'orientation des cellules tumorales vers l'apoptose et/ou vers un arrêt du cycle cellulaire, suite au traitement par les HDACi (Burgess et al., 2001) (Gartel, 2005). La surexpression de p21 conduit par exemple à la résistance cellulaire à l'apoptose induite par les HDACi (Ocker and Schneider-Stock, 2007). Cependant, les effets des HDACi sur l'apoptose de cellules tumorales en l'absence de p21 semblent parfois incohérents. En effet, une étude sur

des cellules de cancer du sein a montré que l'augmentation de la régulation de p21 médiée par les HDACi est requise pour l'induction synergique de l'apoptose par le traitement combiné de l'HDACi et d'anticorps agonistes TNF α /TRAIL/anti-Fas (Chopin et al., 2004). En revanche, une autre étude *in vivo* sur des tumeurs E μ -myc/p21^{-/-} a permis de mettre en évidence que l'induction de p21 ne régit pas l'apoptose des cellules tumorales médiée par les HDACi. p21 ne semble donc pas être un médiateur obligatoire de l'arrêt du cycle cellulaire par les HDACi (Newbold et al., 2012). Le rôle de p21 en tant que déterminant de la réponse des HDACi n'est pas totalement compris.

IV.HDACi et initiation de la réactivation de l'EBV

Comme déjà mentionné, la protéine très précoce, ZEBRA codée par *BZLF1* est un déclencheur majeur de la réactivation de l'EBV. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de ZEBRA au niveau de son promoteur font encore l'objet de nombreuses études *in vitro*. Ils dépendent de l'action d'un ensemble de facteurs cellulaires ou viraux (avec des modifications épigénétiques possibles du génome viral) (Speck et al., 1997), et de la disponibilité des facteurs de transcription cellulaires stimulant la transcription de Zp par rapport à ceux qui la répriment. Les mécanismes moléculaires responsables de la transition entre l'état de latence et la réactivation de l'EBV, ne sont pas totalement élucidés. Par ailleurs, les HDACi dont le vorinostat, sont connus comme des réactivateurs potentiels de ce virus. Le traitement par le vorinostat peut donc permettre de mieux comprendre les étapes précoces de la réactivation tout en apportant des indications sur les conséquences (réactivation virale ou non) de son utilisation dans le cas de traitement de cancers associés à l'EBV.

IV. 1) Promoteur de *BZLF1*, réactivation et MEF2

De nombreux travaux ont été menés pour mieux définir les mécanismes par lesquels les agents inducteurs activent l'expression du gène *BZLF1* (Liu et al., 1997a) (H Gruffat, 2002). Ils concernent la structure de la chromatine au niveau du promoteur du gène, car il s'agit d'un élément essentiel pour qu'il soit activé ou non. Le recrutement spécifique de HDAC va induire des modifications locales de la chromatine, ce qui la rend inaccessible aux facteurs activateurs de la transcription (complexes de remodelage, co-activateurs, composants du complexe de pré-initiation, polymérase II,...) et conduire à sa répression transcriptionnelle. Ces travaux montrent que le promoteur du gène *BZLF1* des cellules B en culture infectées de manière latente par l'EBV est situé au sein d'une chromatine dont les histones H3 et H4 sont

hypoacétylées (chromatine condensée), ce qui pourrait en partie expliquer la répression de l'expression du gène *BZLF1* (H Gruffat, 2002). L'induction de l'expression du gène *BZLF1* par les HDACi tel que le butyrate ou la trichostatine A suggère que la structure de la chromatine joue en effet un rôle important. La manière dont les facteurs à activité HDAC sont recrutés sur le promoteur du gène *BZLF1* et celle par laquelle la répression de ce gène peut être levée est essentielle dans la compréhension du passage de la latence à la réactivation.

Des études ont montré que le facteur MEF2-D est fixé sur le promoteur du gène *BZLF1*, durant la phase de latence virale, et qu'il peut spécifiquement recruter à ce promoteur certaines HDAC de classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9), ce qui pourrait entraîner la formation d'une structure fermée de la chromatine virale au niveau du gène *BZLF1*. Les agents inducteurs, en particulier les iHDAC, pourraient lever cet état de répression et induire le cycle productif de l'EBV. Ces inducteurs induiraient une modification des protéines MEF2-D et des HDAC de classe II (respectivement par déphosphorylation et par phosphorylation) de telle manière qu'elles n'interagissent plus entre elles. La protéine MEF2-D serait alors capable de recruter des facteurs HAT permettant l'ouverture de la chromatine et la transcription du gène *BZLF1* (H Gruffat, 2002) (**Figure 38**).

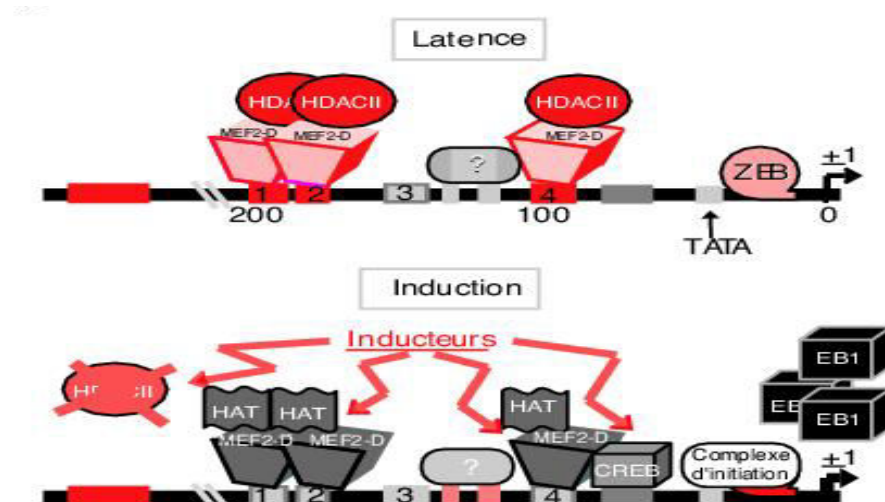


Figure 38 : Modèle du contrôle de l'expression du gène *BZLF1*. Durant la latence virale, l'expression du gène *BZLF1* est bloquée suite au recrutement des HDACII par le MEF2-D fixé sur des sites spécifiques du promoteur. D'autres facteurs répresseurs comme la protéine ZEB peuvent aussi se fixer sur ce promoteur. Les inducteurs du cycle viral productif sont supposés bloquer l'interaction entre les HDACII et MEF2-D permettant le recrutement des HAT par le MEF2-D ainsi que d'autres facteurs activateurs du promoteur du gène *BZLF1*. Le déverrouillage de la chromatine au niveau du promoteur de *BZLF1* peut conduire à l'expression de la protéine EB1/ZEBRA (d'après Manet et al., 2003).

Liu et al. (1997) ont montré par EMSA que MEF2D se lie au motif de liaison ZI, ainsi que MEF2A, mais dans une moindre mesure (Liu et al., 1997a). MEF2C n'a pas été étudié et il est proposé que l'anticorps anti-MEF2B utilisé n'ait pu se fixer dans les conditions testées. Il est toujours probable que les autres membres de la famille MEF2 se lient et activent le promoteur de *BZLF1*. Plus récemment, le clonage du gène MEF2B, en tant que transactivateur du promoteur de *BZLF1*, a été réalisé avec succès et il a été montré que tous les membres de la famille de MEF2 sont exprimés d'une façon ubiquitaire dans les cellules B (Murata et al., 2013b). Il est possible que tous les membres de la famille MEF2 (A, B et C), et non seulement MEF2D, soient capables de se lier au promoteur *BZLF1* et de l'activer. L'effet des facteurs de transcription de la famille MEF2 sur la réactivation de l'EBV est important. Récemment, il a été montré, suite à des mutations ponctuelles dans les motifs ZI A, B et D de liaison à MEF2, que la liaison de MEF2 à ces domaines peuvent contrôler l'expression de *BZLF1* et l'induction de l'expression de ce gène par des agents chimiques dans les cellules B et HEK293 (Murata et al., 2013b).

IV. 2) Rôle du Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)

MEF2 est une famille de facteurs de transcription qui a initialement été montrée comme étant impliquée dans le développement des myocytes. Ces facteurs ont par la suite été décrits comme étant exprimés de manière ubiquitaire, y compris dans les lymphocytes et les cellules épithéliales. Il s'agit en particulier de facteurs intervenant dans la réactivation de l'EBV en se liant au promoteur Zp de *BZLF1*.

IV. 2. 1) Famille des protéines MEF2

Le gène MEF2 (pour « myocyte enhancer factor-2 ») est largement exprimé chez tous les eucaryotes de la levure à l'homme. La famille des facteurs de transcription MEF2 est constituée de 4 protéines différentes chez l'homme : MEF2 -A, -B, -C et -D. Chacune possède un homologue chez d'autres vertébrés qui peuvent avoir des fonctions différentes. MEF2 -A et -C ont des séquences relativement proches, résultant d'un événement de duplication qui a eu lieu lors de l'apparition des vertébrés. En revanche, MEF2B semble avoir divergé à partir d'un seul gène ancestrale. Les organismes modèles *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster* ne possèdent qu'un seul gène de la famille de MEF2.

IV. 2. 2) Structure et localisation des protéines MEF2

Toutes les protéines MEF2 contiennent trois domaines : un domaine N-terminal MADS de

liaison à l'ADN (56 aa), un domaine MEF2 central (29 aa) et un domaine C-terminal de transactivation. Les domaines MADS et MEF2 central sont hautement conservés. Il existe par exemple 91% et 68% d'homologie, respectivement, entre les protéines MEF2A et les protéines MEF2B les plus divergentes. Le domaine de transactivation est par contre beaucoup moins bien conservé entre ces deux protéines MEF2 (6% d'homologie seulement) (Wu et al.) (Potthoff and Olson, 2007) (**Figure 39**).

La boîte MADS est le domaine de liaison minimal à l'ADN. Une extension de 29 aa adjacents au domaine MEF2 central est nécessaire pour qu'il y ait une forte affinité de liaison à l'ADN ainsi que pour leur dimérisation. Ces facteurs ont en effet la capacité de s'homo- et de s'hétérodimériser suite à leur interaction avec la boîte MADS (Molkentin and Olson, 1996). Une séquence de localisation nucléaire classique (NLS) situé à l'extrémité C-terminale de MEF2A, -C, et -D assure de plus leur localisation nucléaire (Borghi et al., 2001). Il est à noter que malgré l'absence de cette séquence NLS chez les MEF2B humaines, ces facteurs sont quand même situés dans le noyau (Yu, 1996).

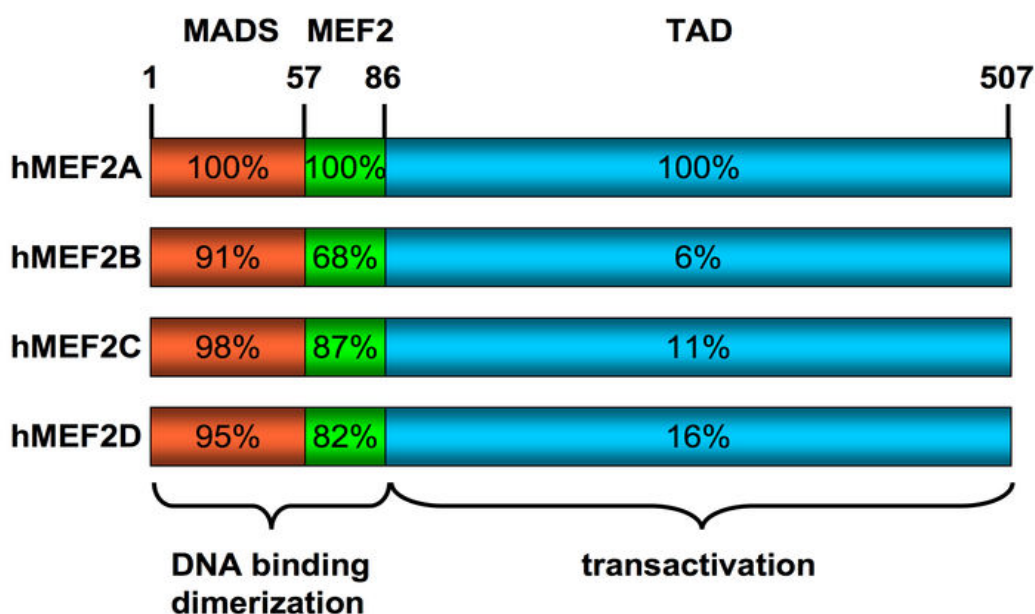


Figure 39 : Organisation des domaines des MEF2 chez l'homme et comparaison des séquences des protéines. La numérotation des acides aminés est indiquée pour le MEF2-A et les pourcentages de conservation des séquences ont été calculés par rapport à MEF2-A. Les trois domaines, MADS (rouges), MEF2 (verts) et les domaines de transactivation TAD (bleu) sont représentés (d'après Potthoff and Olson, 2007).

IV. 2. 3) Signalisation de MEF2 et HDAC II

Les protéines MEF2 sont le point terminal de multiples voies de signalisation et sont des signaux régulateurs de gènes cibles. La voie de signalisation des MAP kinases converge vers les facteurs de MEF2 des cellules de levure jusqu'aux cellules humaines (Dodou and Treisman, 1997) (Han et al., 1997) (Kato et al., 1997). La phosphorylation du TAD de MEF2 par la voie des MAP kinases augmente son activité transcriptionnelle. La MAP kinase ERK5 (également connu sous le nom BMK1 et MAPK7) est par ailleurs considérée comme un co-activateur de MEF2 suite à son association directe avec le domaine MADS (Yang et al., 1998).

L'activité de MEF2 est par ailleurs étroitement contrôlée par les HDACs de classe IIa, qui peuvent s'associer avec le domaine MADS et constituer des complexes de répression multiprotéiques. Ceci conduit à l'inhibition de l'expression des gènes cibles de MEF2, tels que ceux codant pour la myogénine, la myoglobine, la matrice métalloprotéinase 10 (MMP10) et le gène BZLF1 de l'EBV (Bertos et al., 2001) (McKinsey et al., 2001) (McKinsey et al., 2002a) (McKinsey et al., 2002b) (de Ruijter et al., 2003). La voie de signalisation du calcium module également l'activité de MEF2 par de multiples mécanismes, en particulier dans le cas des HDAC. De nombreuses protéines kinases régulées par le calcium, dont PKD (protein kinase D) et les CaMKs (Ca^{2+} /calmoduline-dependent protein kinase), phosphorylent les HDAC de classe II sur une série de résidus sérine conservés. Cette phosphorylation favorise leur translocation du noyau vers le cytoplasme et par conséquent l'activation de MEF2 (par perte d'interaction avec les HDACII) (Zhang et al., 2002) (McKinsey and Olson, 2005) et la modulation de l'expression des gènes cibles. Ces régulations peuvent intervenir en conditions physiologiques ou pathologiques (**Figure 40**).

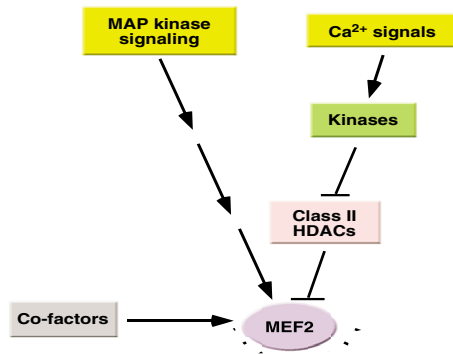


Figure 40 : MEF2 est un régulateur central de l'expression de nombreux gènes cibles. La voie de signalisation des MAP kinases active MEF2. Des signaux dépendants du calcium activent également MEF2 en stimulant des kinases qui phosphorylent les HDAC de classe II, conduisant à leur dissociation de MEF2 et à l'activation de l'expression des gènes cibles. Ces voies ne sont pas fonctionnelles dans tous les types cellulaires sous le contrôle de MEF2 (modifié d'après Potthoff and Olson, 2007).

V. HDACi et autres virus

Concernant les virus non oncolytiques, des études dans différents systèmes expérimentaux ont montré que l'inhibition des HDACs suffit pour réactiver une fraction du virus HIV (human immunodeficiency virus) latent. Ce virus persiste sous forme latente dans les cellules T CD4+, chez les patients infectés sous traitement antirétroviral. La latence est associée à la répression par des HDACs (au moins en partie) de la transcription du virus intégré. La réactivation du HIV par des HDACi permet l'expression du virus, conduisant à la mort de la cellule hôte et à l'élimination du pool cellulaire infecté de manière latente. L'utilisation d'HDACi pourrait être évaluée comme traitement des patients infectés par le HIV (Shirakawa et al., 2013).

Par ailleurs, chez les cellules de PEL (primary effusion lymphoma) infectées par le KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) à l'état latent, le promoteur du gène virale de commutation lytique Rta est organisé en une structure empêchant sa transcription. Les HDACi permettent la réactivation virale suite à un remodelage radical de la topologie du génome et de l'architecture de la chromatine. Cependant, la réactivation n'est pas homogène pour une population cellulaire infectée donnée. Des études suggèrent que l'inhibition des HDAC des classes I et Iia, associée au maintien de l'activité des HDAC6 (HDAC de classe Iib) sont nécessaires pour une réactivation optimale du KSHV (Shin et al., 2014).

Concernant le virus de l'hépatite, des études sur la relation structure-activité d'HDACi (acides hydroxamiques cinnamique et benzo[b]thiophen-2-hydroxamic acid) ont permis d'isoler deux composés possédant une activité anti-HCV (hepatitis C virus) importante et sélective, pouvant être employés pour une optimisation structurale et des études mécanistiques (Ai et al., 2015).

Le virus de l'hépatite B (Hepatitis B virus : HBV) chronique est la principale cause des carcinomes hépatocellulaires (HCC). L'antigène mutant pré-S(2) de surface de l'HBV (LHBS : mutant large HBV surface antigen) a été identifié comme une oncoprotéine virale dans les GGHs (ground glass hepatocytes) de type II. Il interagit directement avec JAB1 (c-Jun activation domain-binding protein 1) pour provoquer la phosphorylation du suppresseur de tumeur du rétinoblastome, conduisant alors à une perturbation de la progression du cycle cellulaire. L'interaction de pré-S(2) avec JAB1 pourrait constituer une cible potentielle pour la chimioprévention. La diminution significative de l'inhibiteur des Cdk (cyclin dependant kinase), p27(Kip1), sert de marqueur pour la formation du complexe associant les pré-S(2) avec JAB1 dans les GGHs. Des études ont montré que le SAHA conduit à une expression élevée du suppresseur de tumeur TBP2 (thioredoxin-binding protein 2) permettant d'améliorer l'interaction JAB1-TBP2 et d'inhiber la dégradation de p27(Kip1) induite par les pré-S(2). Cette inhibition permet alors au cycle cellulaire de revenir à la normale. Les effets pro-oncogéniques induits par les pré-S(2) (augmentation de la prolifération cellulaire, du ratio nucléocytoplasmique et de l'expression d'antigènes de prolifération nucléaires) sont nettement diminués suite au traitement par le SAHA, suggérant que ce dernier puisse constituer un agent prometteur chimiopréventif de l'induction de l'oncoprotéine pré-S(2) dans le cas des carcinomes hépatocellulaires et chez les patients à haut risque infectés par l'HBV et susceptibles de développer un carcinome (Hsieh et al., 2013).

Parmi les virus oncolytiques, on compte les virus de type VSV (Vesicular Stomatitis Virus), HSV-1 (herpes simplex virus 1), EHV-1 (Equine herpesvirus type 1), Ad (Adenovirus), VV (Vaccinia Virus), H-1PV (H-1 Parvovirus) et SFV (Semliki Forest Virus). Ils ciblent et détruisent les cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales. L'emploi de ces virus a été approuvé par le FDA comme mode de traitement mais il est encore nécessaire d'augmenter leur efficacité pour pouvoir les utiliser comme agent thérapeutique chez les patients atteints de cancer. Ces virus peuvent tuer les cellules cancéreuses directement par lyse cellulaire et peuvent stimuler l'induction des réponses immunes antitumorales. Ces dernières peuvent d'une part limiter la réplication et la propagation virale et d'autre part constituer un mécanisme anticancéreux important du traitement par des antiviraux. Plusieurs

groupes ont exploré la possibilité de combiner la thérapie basée sur des virus oncolytiques avec différents HDACi pour inhiber l'activité antivirale résiduelle chez les cellules tumorales et par la suite améliorer la réplication et la propagation des virus oncolytiques. Les effets pléiotropiques des HDACi peuvent améliorer les thérapies associées aux virus oncolytiques grâce à des mécanismes multiples et parfois inattendus. Ces HDACi peuvent renforcer la réplication virale et diminuer l'impact négatif de l'immunité innée dirigée contre l'effet oncolytique (Marchini et al., 2016).

OBJECTIF DE LA PUBLICATION

Les inhibiteurs des HDAC (HDACi) sont des molécules considérées comme très prometteuses dans le traitement des cancers, les modifications du niveau d'expression et de l'activité des HDAC conduisant fréquemment à une activation de la prolifération cellulaire et à des défauts d'apoptose.

Les HDACi de classe II, tel que le vorinostat, sont de plus considérés comme des réactivateurs potentiels de l'EBV, un virus latent de forte prévalence chez l'homme, associé à certains désordres hématologiques, tels que différents types de lymphomes.

Une des méthodes proposée pour cibler spécifiquement les cellules tumorales infectées par l'EBV et induire leur apoptose, tout en évitant le relargage de virions dans l'organisme, a été d'employer simultanément des HDACi avec une molécule anti-virale. Les HDACi doivent permettre la réactivation de l'EBV infectant les cellules de manière latente et la molécule anti-virale, suite à son activation par les kinases virales et cellulaires, doit conduire à la mort par apoptose les cellules infectées. Cette méthode semblait particulièrement intéressante pour le traitement des lymphomes NK/T, fortement associés à l'EBV et impossibles à traiter par les chimiothérapies classiques.

Des expériences préalables à ce travail menées sur deux lignées de cellules NK (SNK6 et MEC04) nous ont permis de mettre en évidence une inhibition de la prolifération cellulaire lors du traitement par le vorinostat, sans jamais pouvoir réactiver l'EBV, alors que dans des conditions d'expérimentation identiques il était possible de le réactiver dans la lignée lymphocytaire B, les P3HR1. Une étude bibliographique nous a de plus permis de voir que la réactivation de l'EBV par les HDACi ciblant les HDAC de classe II ne permettait pas de réactiver systématiquement le virus dans les lignées de type B.

Nous nous sommes posé la question des mécanismes moléculaires impliqués dans la commutation entre cycle latent et cycle lytique de l'EBV lors du traitement par le vorinostat, ainsi que de ceux responsables des inhibitions de prolifération observées en absence de réactivation du virus. Notre étude a portée sur des cellules tumorales lymphocytaires B, de nombreux lymphomes de type B étant associés à l'EBV. Cette étude a été menée dans le but de mieux comprendre la biologie du virus en étudiant les premières étapes de sa réactivation ainsi que dans le but de pouvoir mieux appréhender l'impact du traitement par les HDACi, en particulier du vorinostat, dans le cas des lymphomes B associés à l'EBV.

PUBLICATION :

**PP38 MODULATES THE APOPTOTIC/REACTIVATION BALANCE FOLLOWING
EBV INFECTED B CELLS TREATMENT BY THE HISTONE DEACETYLASE
INHIBITOR VORINOSTAT**

**Pp38 modulates the apoptotic/reactivation balance following EBV infected B cells
treatment by the histone deacetylase inhibitor vorinostat**

**Hazar Al Mohamad^{*}, Heloïse Auclair^{*}, Catherine Ouk-Martin^{*}, Jean Feuillard^{*,&},
Chantal Jayat-Vignoles^{*}**

Running title: Pp38 level triggers apoptosis or EBV reactivation (50 characters/50 max)

^{*}Centre National de la Recherche Scientifique, UMR CNRS 7276, Faculté de Médecine,
Université de Limoges, France

[&]CHU Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, 2 Avenue Martin Luther King, 87042
Limoges Cedex, France

Corresponding author: Chantal Jayat-Vignoles,
E-mail: chantal.vignoles@unilim.fr

Tel: 33 (0) 5 19 56 42 18
Fax: 33 (0) 5 55 43 58 97

Abstract: 199 words/300 max

Main text: 3402 words/3500 max

Key words: EBV, reactivation, apoptosis, vorinostat, p38 MAP kinase

Abstract:

Histone acetylase inhibitors (iHDACs) constitute a promising class of anticancer drugs. They can trigger apoptotic pathway and are proposed for the treatment of hematological disorders. However, iHDACs targeting HDAC class II, such as vorinostat, are also potential reactivating agents of EBV, a virus which infects latently over 90% of the human adult population worldwide and is associated with some B-cell lymphomas. Studying EBV latent-to-lytic switch is essential to consider possible virions release during chemotherapeutic treatments. In this study we examined the effect of vorinostat on EBV infected B cells. We found that the drug can induce apoptosis or EBV reactivation with mutual inhibition. Vorinostat activates constitutively and simultaneously the transcription factor initiator of reactivation MEF2D (by dephosphorylation) as well as the pro-apoptotic MAP kinase p38 (by phosphorylation following decrease of the MAP kinase phosphatase MPK1). Pre-treatment with p38 inhibitor showed that p38 is both involved in EBV reactivation and apoptotic pathways. However, cells for which p38 activation increased sharply in early treatment go directly to apoptosis, preventing thereby EBV reactivation. This raises the question of vorinostat doses during treatment of lymphomas associated with EBV and the need to use or not simultaneously an antiviral drug such as ganciclovir.

Introduction:

The Epstein-Barr virus (EBV) is a herpes virus which infects over 90% of the human adult population worldwide. Primary infection can cause infectious mononucleosis but is usually asymptomatic in infants and young children [1] [2]. The virus, conveyed through saliva, infects oropharyngeal epithelial cells and is transmitted to naive B cells leading to their proliferation and expression of the full repertoire of latent viral genes [3]. Most of infected B cells are eliminated by an anti-EBV T-cell response but some of them differentiate into memory B cells and escape from the immune system following the loss of some viral gene expression. EBV reactivation in some memory B cells leads thereafter to new infection cycles of naive or memory B cells and oropharyngeal epithelial cells with lytic replication. It results by a life-long persistent infection kept under the control of the host immune system, with no apparent pathological consequences [4]. EBV infection is predominantly latent, however persistence in hosts and populations requires a balance between periods of latency and reactivation.

Productive infection is characterized by expression of the lytic cycle proteins, release of new infectious viral particles and cell lysis. It usually takes place in oropharyngeal epithelial cells but can also be initiated during the terminal differentiation of memory B cells into plasma cells during their migration to mucosal epithelium, as tonsils [5] [6]. Lytic cycle is divided into several stages : early gene expression, DNA replication, late gene expression, assembly and egress [7]. Lytic gene expression is sequential and extremely ordered. An important event is the initiation of the latent-to-lytic switch by expression of the very early transactivator proteins ZEBRA/Zta and Rta, respectively encoded by the *BZLF1* and *BRLF1* viral genes. Very early proteins initiate therefore early gene expression (such as viral DNA polymerase

and the DNA polymerase processivity factor BMRF1), which in turn lead to late gene transcription and expression of late proteins, including capsid and envelope glycoproteins [8].

ZEBRA is considered as the key regulator of the EBV latent-to-lytic switch. It preferentially binds to promoters of genes under epigenetic silencing by methylation during latency [9] and can activate its own and Rta promoters and early viral genes. ZEBRA also interacts with major cellular functions. Among them, it induces MMP9 (a matrix metalloproteinase implicated in tumor invasion and metastasis) and IL-10 (an immunosuppressive cytokine) expressions [10] [11]. ZEBRA possesses homologous DNA-binding domain with AP-1 bZip activators such as c-Fos [12], interacts with the histone acetylase and transcriptional coactivator CREB-binding protein (CBP) [13] or binds to both the transcription factors p53 and NF- κ B by an ankiryin-like region [14], like the NF- κ B inhibitor I κ B.

Depending on stimuli, *BZLF1* promoter (Zp) can be activated by recruitment of cellular transcription factors such as unphosphorylated MEF2 (Myocyte enhancer factor 2), Sp1, Sp3 and related members of the Sp/KLF family (specificity protein/Krüppel-like factor) to ZI motifs [15] [16] [17]. ZII motifs can contribute by recruiting AP-1 (activator protein 1), c-jun, c-fos, a spliced form of XBP-1 (X-box binding protein 1) and CREB/ATF (c-AMP response element-binding protein)/Activating transcription factor) complex [16] [18] [8]. SBE (Smad responsive elements) of Zp can bind Smad, following activation of TGF- β signalisation [18]. Moreover, ZEBRA can activate its promoter by itself by binding to ZIII motifs.

Some exogenous stimuli are competent to trigger the latent-to-lytic switch. It includes protein kinase C agonists such as phorbol ester, anti-immunoglobulin, calcium ionophores, TGF- β (transforming growth factor-beta) or demethylating agents such as azacytidine [19] [20] [21]. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) like n-butyrate, Trichostatin A or vorinostat can also

initiate lytic cycle [22]. Vorinostat is an inhibitor with a large spectrum : it can inhibit histone deacetylase (HDAC) of class I (HDAC-1, 2, 3 and 4), II (HDAC-6, 8) and IV by insertion in the catalytic pocket of the enzyme [23] [24]. *BZLF1* promoter of latently infected B cells is located within hypoacetylated condensed chromatin, inaccessible for transcription factors owing to the recruitment of class II histone deacetylases (HDAC4, -5, -7 and -9) by phosphorylated MEF2D bound on Zp [8]. Class II HDACi, as vorinostat, are supposed to lead to MEF2D/HDAC dissociation and therefore to HAT (histone acetyltransferase) recruitment, chromatin acetylation and relaxation and *BZLF1* gene transcription. The ability of agents to induce the EBV lytic cycle is highly conditioned by the cell background in which the virus is latent [23].

In this study, we wanted to determine effect of vorinostat on EBV infected B cell lines and clarify underlying molecular mechanisms involved in the initiation of EBV reactivation during HDACi treatment. By comparing various EBV infected B cell lines, we found that vorinostat is able to induce EBV reactivation or apoptosis with mutual inhibition. We showed that vorinostat activates constitutively and simultaneously the transcription factor initiator of reactivation MEF2D and the pro-apoptotic MAP kinase p38. Cell lines for which Pp38 increased sharply compared to the basal level direct to apoptosis and not to reactivation. This raises the issue of EBV reactivation during lymphoma treatments by HDACi, including vorinostat.

Materials and methods:

Cell lines, drugs and chemical treatments. B95.8 (an EBV-producing marmoset B-cell line) [24], P3HR1 (a Burkitt Lymphoma EBV-producing cell line originally obtained from the Jijoye cell line) [25], PRI, RUD and 1602 (lymphoblastoid cell lines, LCLs), BL2 and BL41 (EBV-negative Burkitt Lymphoma-cell lines) and their EBV-infected counterparts BL2.B95.8 and BL41 B95.8 (infected with the EBV wild-type strain B95.8), were cultured in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Inc.), supplemented with 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 1mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine (All from Gibco MC2, Clermont Ferrand, France) and 10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and maintained in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were treated with the HDAC inhibitor vorinostat/SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) (MedChem Express, MED, France) for 48h at 25 µM (we defined this dose as the concentration for 50% of proliferation inhibition by MTS assays). Cells were pretreated or not with the p38 inhibitor SB203580 (25 µM) (Calbiochem, VWR, Strasbourg, France) for 24h. All drugs were reconstituted in dimethyl sulfoxide (DMSO), used as control treatment.

Real-time quantitative-PCR. Extraction of RNA were performed as described elsewhere [26] [27]. Reverse transcription was performed using Superscript II (Invitrogen) on 1 to 5 µg of total RNA. We defined, as reference a pool of RNA extracted from untreated BL2 cell line. RNA levels for the thymidine kinase (TK) genes were quantified in parallel with the different RNA extracts and the RNA pool on an ABI Prism 7000 automat using the TaqMan R assay on-demand gene expression reference system (Applied Biosystems). All amplification steps were performed in duplicate. The calculated relative gene expression level was equal to $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where C_T is the cycle threshold, as previously described [26] [27].

Flow-cytometric analysis. BMRF1 expression was assessed after permeabilization with the IntraPrep Permeabilization Reagent kit (Beckman Coulter A07803) and indirect immunostaining with anti-BMRF1 (mouse monoclonal anti-EBV EA-D-p52\50, Millipore Temecula Californie, MAB8186) revealed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen). **Apoptotic rate** was measured using annexin V-FITC (BD Pharmingen) according manufacturer's instructions ; propidium iodide (Sigma) was added at 50 µg/ml just before analysis to assess membrane permeability. For **cell cycle analysis**, 2×10^6 cells were suspended in 70% ethanol on ice and kept overnight at -20°C. After washing with PBS and treatment with RNaseA (Roche diagnostics) for 20 min at room temperature, 50 µg/ml propidium iodide was added to stain DNA. Analysis were performed on a FACSCalibur (Becton Dickinson). Alexa Fluor 488, FITC and propidium iodide were excited with a 488-nm argon laser. Fluorescence of Alexa Fluor 488 and FITC were collected with a 530±15-nm band-pass filter, while propidium iodide fluorescence was collected with a 650-nm long-pass filter.

Immunofluorescence double staining for confocal microscopy. 5×10^5 cells were permeabilized with IntraPrep Permeabilization Reagent kit. Primary antibodies were anti-BMRF1 (mouse monoclonal anti-EBV EA-D-p52\50) and anti-cleaved caspase 3 (Rabbit polyclonal D175, Cell signaling) and secondary antibodies were Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 633 F(ab')₂ donkey anti-rabbit IgG respectively (both from Invitrogen). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1mg/mL). Images were collected using a Zeiss LSM-510 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Marly-le-Roi, France). DAPI, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 633 were excited with a 405-nm laser diode, a 488-nm argon laser and a 633-nm helium–neon laser, respectively. Fluorescence of DAPI, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 633 were collected with a 420±30-

nm band-pass filter, 530±15-nm band-pass filter and 650-nm long-pass filter, respectively.

Western blotting. Total protein extracts were obtained as described [28]. For western blots, primary antibodies were anti-MPK1 (Rabbit polyclonal C-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1/100), anti-p38 (Rabbit polyclonal #9212, Cell signaling technology at 1/1000), anti-Pp38 (mouse monoclonal IgG1 #9216, Cell signaling technology, at 1/2000), anti-MEF2A (Rabbit polyclonal H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1/100), anti-PMEF2A (Rabbit polyclonal to MEF2A (phospho T312), abcam at 1/500), anti-MEF2C (mouse monoclonal F-10, Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1/100), anti-PMEF2C (Rabbit polyclonal to MEF2C (phospho S396), abcam at 1/500), anti-MEF2D (mouse monoclonal H-11, Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1/100), anti-PMEF2D (Rabbit polyclonal to MEF2D (phospho S444), abcam at 1/500) and anti-actine (mouse monoclonal IgG1 isotype, Sigma-Aldrich, at 1/5000). Secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were used at 1/5000 for 1 h.

Results:

Treatment by vorinostat triggers reactivation or apoptosis in EBV infected B cells.

Vorinostat is a HDACi described as an inducer of EBV reactivation. However its ability to trigger latent-to-lytic switch depends on various factors such as drug concentration, cell type and background. We looked for EBV reactivation in some tumoral B cell lines : BL2B95.8 and BL41B95.8 Burkitt lymphomas (BL), PRI, RUD and 1602 lymphoblastoid cell lines (LCLs). Uninfected BL counterparts (BL2 and BL41) were used as negative controls. Positive controls were the BL P3HR1 cell line (known for EBV reactivation by vorinostat) and the B95.8 cell line (in EBV lytic cycle). Cells were treated by 25 μ M of vorinostat for 48h.

We analyzed the transcriptional expression of the early viral lytic gene thymidine kinase (TK) induced by immediate early genes following reactivation. Negative threshold was set for the values obtained for uninfected cell lines. As expected, high expression was observed for P3HR1 and B95.8 cell lines after vorinostat treatment, with a sharp increase for P3HR1. Increased was moderated for B95.8 since this cell line was already in lytic cycle. 1602 LCL showed low mRNA TK expression before or after treatment and insignificant values were obtained for other cell lines (data not shown for BL41, PRI and RUD) (**Figure 1A**). To validate previous observations we analyzed expression of the early lytic viral protein BMRF1 by flow cytometry. BMRF1 expression was observed for 1602, P3HR1 and B95.8, with a net increase of positive cells after treatment for P3HR1 and B95.8 (1.5% to 34.9% and 5.3% to 49.8%, respectively). BMRF1 expression appeared decreased for 1602 (**Figure 1B**). Vorinostat can induce EBV reactivation in some tumoral B cells and does not necessarily potentiates it.

Inhibition of proliferation was observed for all our cell lines treated by vorinostat (IC50 dose), even though reactivation was not observed. Since HDACi are known for their apoptotic effects on some tumoral cell lines, including B cells, we looked at the subG1 peak (representative of DNA fragmentation in late stage of apoptosis) by flow cytometry. Same cell lines and treatments than for reactivation experiments were used. An important sub-G1 peak was observed after vorinostat treatment for BL2B95.8, BL41B95.8 and 1602 cell lines whereas it was very weak for P3HR1 and B95.8 (**Figure 2A**). High sub-G1s were also obtained for BL2, PRI and RUD. Apoptosis was not observed for BL41 as usually observed due to its p53 mutation (data not shown). To confirm our results an annexin-V test (allowing to show externalization of plasma membrane phosphatidylserine in early stage of apoptosis) was carried on by flow cytometry. Three different cytogram patterns were observed: i) a high increase of annexin-V positive cells, like for BL41B95.8 (similar results were obtained for BL2, BL2B95.8, PRI and RUD, data not shown), ii) an important increase of apoptotic cells with a minority sub-population of partially permeabilized (propidium iodide intermediary) and annexin-V negative cells for 1602 and iii) a high increase of partially permeabilized cells (possibly due to plasma membrane disturbance following vesicle fusion for virion egress), like for P3HR1 (similar results were obtained for B95.8, data not shown) (**Figure 2B**). Our results show that vorinostat treatment lead EBV infected B cells either to lytic cycle or to apoptosis, and do not systematically potentiates reactivation (as observed for 1602).

Reactivation and apoptosis are mutually exclusive. Vorinostat treatment induced apoptosis in BL2, BL2B95.8, BL41B95.8 PRI, RUD and 1602 cell lines (with rare cells expressing BMRF1 for 1602), whereas it leads to reactivation for P3HR1 and B95.8 (with higher expression of BMRF1 for P3HR1) and very low apoptosis. Analysis at the cellular level were carried out by confocal microscopy after immunofluorescent double staining of BMRF1 and cleaved-caspase 3 (an apoptotic effector caspase). Nuclei were counterstained with the DAPI

DNA dye. After 48h of vorinostat treatment we observed apoptosis for 1602 cells (similar results were obtained for BL2, BL2B95.8, BL41B95.8, PRI and RUD, data not shown), whereas P3HR1 cells expressed either BMRF1 (the large majority) or cleaved-caspase 3 for some rare cells (similar results were observed for B95.8, data not shown) (**Figure 3**). Our results suggest that it exists a decisional point at which EBV infected B cells may enter into apoptosis or in lytic cycle.

Vorinostat can inhibit the initiation of EBV reactivation induced by itself. During latency, transcription factors of the MEF2 (myocyte enhancer factor 2) family interacts with HDAC II (for which vorinostat is an inhibitor), leading to the inhibition of their target genes, like *BZLF1*. HDACi allows HDAC departures, histone acetylation by HAT, MEF2 dephosphorylation and reactivation, as clearly demonstrated for MEF2-D [8] [29]. For all tested cell lines, we observed that vorinostat treatment did not modify MEF2A, -C and -D expression level but it always strongly decrease their phosphorylation (including MEF2-D). (**Figure 4**). This result implies that another event with more weightiness than MEF2 dephosphorylation will decide if EBV infected B cells can go or not in reactivation when treated by vorinostat.

p38 activation is necessary for reactivation but an excessive increase leads to apoptosis. The MAP kinase p38 has already been showed as involved in EBV reactivation [30] [31] but also possesses pro-apoptotic properties. We asked us if p38 activation could be at the crossroad of apoptosis and reactivation. For this purpose, cells were pretreated by the Pp38 inhibitor SB203580 before adding vorinostat, then apoptosis and EBV reactivation were evaluated. For BL2B95.8, the rate of apoptotic cells strongly decreased with the inhibitor : 50% to 30% No effect of SB203580 by itself was observed (**Figure 5 A**). Similar results were obtained for BL41B95.8 and PRI (data not shown). For P3HR1, the percentage of cells

expressing BMRF1 after vorinostat treatment strongly decreased in the presence of the inhibitor : 20% to 10%. No effect of SB203580 by itself was observed (**Figure 5B**). Similar results were obtained for B95.8. This results show that Pp38 is implied in both EBV reactivation and apoptotic pathways during vorinostat treatment.

Analysis of Pp38 by western blot showed that vorinostat treatment did not modify p38 expression levels but always lead to its activation by phosphorylation. At the same time, expression level of the MAP kinase phosphatase MPK1 (for which Pp38 is a substrate) decreased, which could explain Pp38 higher levels following treatment. Similar results were obtained for BL41B95.8 and RUD (data not shown) (**Figure 6 A**). Analysis of the ratio of Pp38 expression level after to before treatment by vorinostat (both standardized to p38 expression level) revealed higher values for cell lines undergoing apoptosis. Dramatically low value was obtained for B95.8 (cell line with the most expressed reactivation markers (**Figure 6B**)). Activation of the pro apoptotic MAP kinase p38 is involved in both apoptosis and reactivation pathways but our results suggest that an excessive increase following vorinostat treatment could constrain cells to enter apoptosis rather than lytic cycle.

Discussion :

iHDAC are both a promising class of anticancer drugs and a potential reactivating agents of EBV. The iHDAC vorinostat is proposed for the treatment of hematological disorders such as lymphomas associated with EBV [32]. Taking into account viral reactivation and possible release of virions in large quantities within the body during treatment is essential. We show that vorinostat triggers apoptosis or reactivation in EBV infected B cells and that an excessive increase of p38 activation by vorinostat is concomitant of cell entry into apoptosis rather than EBV reactivation.

iHDAC can inhibit HDAC whose alteration of function or expression are closely implied in carcinogenesis and cancer development by repression of, tumor suppressor genes, cell cycle inhibitors, differentiation factors or apoptosis inducers [33]. iHDAC can also induce EBV reactivation [8] [34], but their role is not clear since it depends on cell background and experimental conditions. iHDAC that target HDACII (blocking MEF2D and therefore *BZLF1* expression) such as vorinostat, trichostatin, sodium butyrate, MS-275, apicidine or valproate induce lytic cycle. However, butyrate is effective on P3HR1 and BL cells whereas valproate was effective only on P3HR1 [22] [35] [36]. Otherwise, MS-275 or apicidin trigger lytic cycle only in a range of given concentration, higher resulting in cell count decrease with very low reactivation [22], suggesting another mechanism for cell death.

Treatments by iHDAC generally leads to reactive oxygen species (ROS) production, whose accumulation can trigger apoptosis [37] [38] [39]. Furthermore, transformed cells are more sensitive than normal cells since expression of TBP-2 (Trx Binding Protein-2), an inhibitor of the ROS scavenger thioredoxin, is generally increased [40] [41]. Vorinostat treatment can trigger the apoptotic mitochondrial intrinsic pathway following ROS production and Bid

cleavage [42]. Pre-treatment by ROS scavengers such as N-acetyl cysteine (NAC) also decreases apoptosis induced by iHDAC [42] [43] [44] [45].

p38 is a pro-apoptotic MAP kinase highly sensitive to activation by oxidative stress. It alters expression and/or activity of proteins of the Bcl2 family, as reported during iHDAC treatments. It has indeed been observed decreases of anti-apoptotic molecules such as Bcl2 or Bcl-X_L and increases of pro-apoptotic factors like Bim, Bmf, Bad, Bid, Noxa, Puma, Bax or Bak [46] [47] [48] [49] [50] [51]. p38 is also of importance for EBV reactivation. Short interfering RNAs targeting p38 or inhibition of p38 activation induced by nocodazole or ROS inhibits ZEBRA or Rta expression in epithelial cells [30] [52] [53]. Inhibition of p38 pathway largely prevents lytic gene expression in Raji lymphoma B cells [31] as well as induction of lytic cycle by methotrexate in lymphoblastoid and gastric carcinoma cell lines [54]. According to its expression level, the MAP kinase p38 could thus be at the crossroads of EBV reactivation and apoptosis during iHDAC treatments of EBV infected B cells..

It is generally admitted that life cycle of EBV consists of lytic and *latent* phases. However, apoptotic pathways are often engaged. latency II or III, expression of latent membrane proteins LMP1 and LMP2A leads to constitutive activation of the pro-apoptotic MAP kinases p38 and/or JNK (JNK and p38 for LMP1, JNK for LMP2A) [55] [56] [57]. LMP1 can induce mitochondria disruption, cytochrome c release and activation of the cascade of caspases [58] [59] and sensitizes LCLs to cytotoxic T-lymphocytes by overexpression of the pro-apoptotic receptor Fas/CD95 on their surface, leading to the engagement of the Fas/FasL axis [60] [61]. Moreover, as demonstrated in our previous work, strongest expression of Fas, leads to its autoactivation and apoptosis of EBV latency III B cells [60]. In the present work we show that a balance can also take place between apoptosis and lytic cycle during early stages of the

reactivation. Homeostasis of EBV infected B cell compartment could thus be regulated by an equilibrium between all three major statements : latency, reactivation and apoptosis.

Otherwise, EBV is associated with a variety of lymphoid malignancies such as lymphomas and HDACi are promising anticancer molecules. In 2006, the FAD (Food and Drug Administration) gave its agreement for the treatment of lymphoproliferative disorder CTCL (cutaneous T-cell lymphoma), by vorinostat (marketed as Zolinza® , Merck &Co, Inc.). This lymphoma can be associated with EBV. Vorinostat has also been investigated for the treatment of other lymphomas associated with EBV [39], including multiple myelomas (MM), non Hodgkin lymphomas (NHL) or Hodgkin lymphomas [63] [64] [65]. Our work raises the issue of latent virus reactivation and virion release in organism during treatments of lymphomas by HDACi, including EBV and other virus reactivable by iHDAC such as HIV (Human immunodeficiency virus) [66] or KSHV (Kaposi sarcoma-associated herpes virus) [67]. The systemic use of an anti viral such as ganciclovir during chemotherapeutic treatments could target cells in which the virus reactivates.

Titles and legends of figures:

Figure 1 : Treatment by vorinostat triggers or not reactivation of EBV infected B cells.

Cells were treated or not with vorinostat (25 μ M for 48h). Induction of reactivation was evaluated for BL2, BL2B95.8, BL41B95.8, 1602, P3HR1 and B95.8 cell lines **A)** by calculating TK relative mRNA expression evaluated by real-time RT-PCR and **B)** by flow cytometry after labeling of BMRF1 by immunofluorescence. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2 : Treatment by vorinostat triggers or not apoptosis of EBV infected B cells.

Cells were treated or not with vorinostat (25 μ M for 48h). Apoptosis induction was analyzed by flow cytometry **A)** for BL2B95.8, BL41B95.8, 1602, P3HR1 and B95.8 cell lines by evaluating the percentage of cells in sub-G1 phase after cell cycle analysis (propidium iodide staining of total DNA content) and **B)** for BL41B95.8, 1602 and P3HR1 cell lines after labeling of external phosphatidyl serine residues by annexin-V-FITC and membrane permeability by propidium iodide. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3 : Apoptosis and reactivation are mutually exclusive. 1602 and P3HR1 cells were treated or not with vorinostat (25 μ M for 48 h). BMRF1 and cleaved-caspase 3 expression were revealed by indirect immunofluorescence (alexa 488 green fluorescence and Alexa 633 red fluorescence, respectively) and observed by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with the nuclear dye DAPI. Original magnification X 630

Figure 4 : Vorinostat constantly inhibits MPK1 and activates the pro-apoptotic p38 MAP kinase. BL41.B95.8, BL2B95.8, PRI, 1602, P3HR1 and B95.8 cells were treated with

vorinostat (25 μ M for 48h). MEF2A, -C, -D and Phospho MEF2A, -C, -D as well as actin (loading control) were analyzed by western blot. Results are representative of three independent experiments.

Figure 5 : p38 phosphorylation controls apoptosis as well as reactivation. BL2B95.8 or P3HR1 cells were pre-treated or not with the Pp38 inhibitor SB203580 before treatment by vorinostat (25 μ M for 48h). **A)** Apoptosis of BL2B95.8 was evaluated by flow cytometry after labeling of external phosphatidyl serine residues by Annexin-V-FITC and membrane permeability by propidium iodide and **B)** Reactivation of P3HR1 cells was evaluated by flow cytometry after labeling of BMRF1 by immunofluorescence. Results are representative of three independent experiments.

Figure 6 : Apoptosis is concomitant with high increase in p38 activation. BL41.B95.8, BL2B95.8, PRI, 1602, P3HR1 and B95.8 cells were treated with vorinostat (25 μ M for 48h). **A)** p38, Phospho p38, MPK1 (p38 phosphatase), as well as actin (loading control) were analyzed by western blot. and **B)** Ratio of Phospho p38 expression after to before treatment by vorinostat (both standardized to p38) were analyzed with Image Lab softwareTM. Results are representative of three independent experiments.

Bibliography:

- [1] G. Henle, W. Henle, P. Clifford, V. Diehl, G. W. Kafuko, B. G. Kirya, G. Klein, R. H. Morrow, G. M. Munube, P. Pike, P. M. Tukei, et J. L. Ziegler, « Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 43, n° 5, p. 1147-1157, nov. 1969.
- [2] J. I. Cohen, « Epstein-Barr virus infection », *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, n° 7, p. 481-492, août 2000.
- [3] O. A. Odumade, K. A. Hogquist, et H. H. Balfour, « Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 24, n° 1, p. 193-209, janv. 2011.
- [4] L. S. Young et A. B. Rickinson, « Epstein-Barr virus: 40 years on », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 10, p. 757-768, oct. 2004.
- [5] L. L. Laichalk et D. A. Thorley-Lawson, « Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo », *J. Virol.*, vol. 79, n° 2, p. 1296-1307, janv. 2005.
- [6] Y. Al Tabaa, E. Tuaillon, K. Bollore, V. Foulongne, G. Petitjean, J.-M. Seigneurin, C. Duperray, C. Desgranges, et J.-P. Vendrell, « Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells », *Blood*, vol. 113, n° 3, p. 604-611, janv. 2009.
- [7] L. S. Young, J. R. Arrand, et P. G. Murray, « EBV gene expression and regulation », 2007.
- [8] T. Murata, « Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency », *Microbiol. Immunol.*, vol. 58, n° 6, p. 307-317, juin 2014.
- [9] P. M. Bhende, W. T. Seaman, H.-J. Delecluse, et S. C. Kenney, « The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome », *Nat. Genet.*, vol. 36, n° 10, p. 1099-1104, oct. 2004.
- [10] T. Yoshizaki, H. Sato, S. Muro, J. S. Pagano, et M. Furukawa, « Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator », *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 17, n° 5, p. 431-436, juill. 1999.
- [11] T. Sairenji, E. Ohnishi, S. Inouye, et T. Kurata, « Induction of interleukin-10 on activation of Epstein-Barr virus in EBV-infected B-cell lines », *Viral Immunol.*, vol. 11, n° 4, p. 221-231, 1998.
- [12] J. L. Kolman, N. Taylor, L. Gradoville, J. Countryman, et G. Miller, « Comparing transcriptional activation and autostimulation by ZEBRA and ZEBRA/c-Fos chimeras », *J.*

Virol., vol. 70, n° 3, p. 1493-1504, mars 1996.

[13] A. L. Adamson et S. Kenney, « The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein », *J. Virol.*, vol. 73, n° 8, p. 6551-6558, août 1999.

[14] D. H. Dreyfus, Y. Liu, L. Y. Ghoda, et J. T. Chang, « Analysis of an ankyrin-like region in Epstein Barr Virus encoded (EBV) BZLF-1 (ZEBRA) protein: implications for interactions with NF- κ B and p53 », *Virol. J.*, vol. 8, p. 422, 2011.

[15] S. Liu, P. Liu, A. Borrás, T. Chatila, et S. H. Speck, « Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member », *EMBO J.*, vol. 16, n° 1, p. 143-153, janv. 1997.

[16] S. Liu, A. M. Borrás, P. Liu, G. Suske, et S. H. Speck, « Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter », *Virology*, vol. 228, n° 1, p. 11-18, févr. 1997.

[17] H. Bryant et P. J. Farrell, « Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency », *J. Virol.*, vol. 76, n° 20, p. 10290-10298, oct. 2002.

[18] T. Iempridee, S. Das, I. Xu, et J. E. Mertz, « Transforming growth factor beta-induced reactivation of Epstein-Barr virus involves multiple Smad-binding elements cooperatively activating expression of the latent-lytic switch BZLF1 gene », *J. Virol.*, vol. 85, n° 15, p. 7836-7848, août 2011.

[19] J. Luka, G. Miller, H. Jörnvall, et G. R. Pearson, « Characterization of the restricted component of Epstein-Barr virus early antigens as a cytoplasmic filamentous protein », *J. Virol.*, vol. 58, n° 3, p. 748-756, juin 1986.

[20] K. Takada et Y. Ono, « Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes », *J. Virol.*, vol. 63, n° 1, p. 445-449, janv. 1989.

[21] H. Fahmi, C. Cochet, Z. Hmama, P. Opolon, et I. Joab, « Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway », *J. Virol.*, vol. 74, n° 13, p. 5810-5818, juill. 2000.

[22] S. K. Ghosh, S. P. Perrine, R. M. Williams, et D. V. Faller, « Histone deacetylase inhibitors are potent inducers of gene expression in latent EBV and sensitize lymphoma cells to nucleoside antiviral agents », *Blood*, vol. 119, n° 4, p. 1008-1017, janv. 2012.

[23] J. S. Carew, F. J. Giles, et S. T. Nawrocki, « Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy », *Cancer Lett.*, vol. 269, n° 1, p. 7-17, sept. 2008.

- [24] V. M. Richon, « Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor », *Br. J. Cancer*, vol. 95, n° Suppl 1, p. S2-S6, déc. 2006.
- [25] L. Gradoville, D. Kwa, A. El-Guindy, et G. Miller, « Protein Kinase C-Independent Activation of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle », *J. Virol.*, vol. 76, n° 11, p. 5612-5626, juin 2002.
- [26] R. E. Callard, Y. L. Lau, J. G. Shields, S. H. Smith, J. Cairns, L. Flores-Romo, et J. Gordon, « The marmoset B-lymphoblastoid cell line (B95-8) produces and responds to B-cell growth and differentiation factors: role of shed CD23 (sCD23) », *Immunology*, vol. 65, n° 3, p. 379-384, nov. 1988.
- [27] M. K. Y Hinuma, « Immunofluorescence and Herpes-Type Virus Particles in the P3HR-1 Burkitt Lymphoma Cell Line », *J. Virol.*, vol. 1, n° 5, p. 1045-51, 1967.
- [28] F. Baran-Marszak, J. Feuillard, I. Najjar, C. Le Clorennec, J.-M. Béchet, I. Dusanter-Fourt, G. W. Bornkamm, M. Raphaël, et R. Fagard, « Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells », *Blood*, vol. 104, n° 8, p. 2475-2483, oct. 2004.
- [29] J. Gabert, E. Beillard, V. H. J. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cavé, F. Pane, J. L. E. Aerts, D. De Micheli, X. Thirion, V. Pradel, M. González, S. Viehmann, M. Malec, G. Saglio, et J. J. M. van Dongen, « Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program », *Leukemia*, vol. 17, n° 12, p. 2318-2357, oct. 2003.
- [30] S. Durand-Panteix, M. Farhat, I. Youlyouz-Marfak, P. Rouaud, C. Ouk-Martin, A. David, N. Faumont, J. Feuillard, et C. Jayat-Vignoles, « B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 189, n° 1, p. 181-190, juill. 2012.
- [31] E. Manet, A. Sergeant, et H. Gruffat, « Cycle productif du virus d'Epstein-Barr : rôle de la protéine virale EB1 dans l'activation du cycle productif et interactions protéine EB1-cellules hôte », *Virologie*, vol. 7, n° 2, p. 111-123, mars 2003.
- [32] X. Gao, H. Wang, et T. Sairenji, « Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or c-myc in EBV-positive epithelial cells », *J. Virol.*, vol. 78, n° 21, p. 11798-11806, nov. 2004.
- [33] G. Matusali, G. Arena, A. De Leo, L. Di Renzo, et E. Mattia, « Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji

cells exposed to lytic cycle inducing compounds », *Mol. Cancer*, vol. 8, p. 18, 2009.

[34] M. Duvic et M. Dimopoulos, « The safety profile of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in hematologic malignancies: A review of clinical studies », *Cancer Treat. Rev.*, vol. 43, p. 58-66, févr. 2016.

[35] W. K. Kelly, O. A. O'Connor, et P. A. Marks, « Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials », *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 11, n° 12, p. 1695-1713, déc. 2002.

[36] T. Murata et T. Tsurumi, « Switching of EBV cycles between latent and lytic states », *Rev. Med. Virol.*, vol. 24, n° 3, p. 142-153, mai 2014.

[37] D. Daigle, L. Gradoville, D. Tuck, V. Schulz, R. Wang'ondou, J. Ye, K. Gorres, et G. Miller, « Valproic acid antagonizes the capacity of other histone deacetylase inhibitors to activate the Epstein-barr virus lytic cycle », *J. Virol.*, vol. 85, n° 11, p. 5628-5643, juin 2011.

[38] K. L. Gorres, D. Daigle, S. Mohanram, G. E. McInerney, D. E. Lyons, et G. Miller, « Valpromide Inhibits Lytic Cycle Reactivation of Epstein-Barr Virus », *mBio*, vol. 7, n° 2, 2016.

[39] R. R. Rosato, J. A. Almenara, Y. Dai, et S. Grant, « Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 2, n° 12, p. 1273-1284, déc. 2003.

[40] R. R. Rosato, S. C. Maggio, J. A. Almenara, S. G. Payne, P. Atadja, S. Spiegel, P. Dent, et S. Grant, « The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide », *Mol. Pharmacol.*, vol. 69, n° 1, p. 216-225, janv. 2006.

[41] P. A. Marks, « Thioredoxin in cancer--role of histone deacetylase inhibitors », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 16, n° 6, p. 436-443, déc. 2006.

[42] J. S. Ungerstedt, Y. Sowa, W.-S. Xu, Y. Shao, M. Dokmanovic, G. Perez, L. Ngo, A. Holmgren, X. Jiang, et P. A. Marks, « Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 3, p. 673-678, janv. 2005.

[43] M. Dokmanovic et P. A. Marks, « Prospects: histone deacetylase inhibitors. - PubMed - NCBI », *Journal of Cellular Biochemisrty*, 2005.

[44] A. A. Ruefli, M. J. Ausserlechner, D. Bernhard, V. R. Sutton, K. M. Tainton, R. Kofler, M. J. Smyth, et R. W. Johnstone, « The histone deacetylase inhibitor and

chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 19, p. 10833-10838, sept. 2001.

[45] C. Yu, B. B. Friday, J.-P. Lai, A. McCollum, P. Atadja, L. R. Roberts, et A. A. Adjei, « Abrogation of MAPK and Akt signaling by AEE788 synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through reactive oxygen species generation », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 13, n° 4, p. 1140-1148, févr. 2007.

[46] T. Yoshioka, S. Yogosawa, T. Yamada, J. Kitawaki, et T. Sakai, « Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS », *Gynecol. Oncol.*, vol. 129, n° 2, p. 425-432, mai 2013.

[47] Y. Zhu, K. Das, J. Wu, M. H. Lee, et P. Tan, « RNH1 regulation of reactive oxygen species contributes to histone deacetylase inhibitor resistance in gastric cancer cells », *Oncogene*, vol. 33, n° 12, p. 1527-1537, mars 2014.

[48] A. M. Gillenwater, M. Zhong, et R. Lotan, « Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, n° 11, p. 2967-2975, nov. 2007.

[49] G. Iacomino, M. C. Medici, et G. L. Russo, « Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis », *Anticancer Res.*, vol. 28, n° 2A, p. 855-864, avr. 2008.

[50] L.-Y. Bai, H. A. Omar, C.-F. Chiu, Z.-P. Chi, J.-L. Hu, et J.-R. Weng, « Antitumor effects of (S)-HDAC42, a phenylbutyrate-derived histone deacetylase inhibitor, in multiple myeloma cells », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 68, n° 2, p. 489-496, août 2011.

[51] Y. Zhao, J. Tan, L. Zhuang, X. Jiang, E. T. Liu, et Q. Yu, « Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 44, p. 16090-16095, nov. 2005.

[52] W. Xu, L. Ngo, G. Perez, M. Dokmanovic, et P. A. Marks, « Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 42, p. 15540-15545, oct. 2006.

[53] G. M. Matthews, A. Newbold, et R. W. Johnstone, « Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity », *Adv. Cancer Res.*, vol. 116, p. 165-197, 2012.

[54] Y.-R. Liu, S.-Y. Huang, J.-Y. Chen, et L. H.-C. Wang, « Microtubule depolymerization activates the Epstein-Barr virus lytic cycle through protein kinase C pathways in

nasopharyngeal carcinoma cells », *J. Gen. Virol.*, vol. 94, n° Pt 12, p. 2750-2758, déc. 2013.

[55] S.-Y. Huang, C.-Y. Fang, C.-C. Wu, C.-H. Tsai, S.-F. Lin, et J.-Y. Chen, « Reactive oxygen species mediate Epstein-Barr virus reactivation by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine », *PloS One*, vol. 8, n° 12, p. e84919, 2013.

[56] W. Feng, J. I. Cohen, S. Fischer, L. Li, M. Sneller, R. Goldbach-Mansky, N. Raab-Traub, H.-J. Delecluse, et S. C. Kenney, « Reactivation of Latent Epstein-Barr Virus by Methotrexate: A Potential Contributor to Methotrexate-Associated Lymphomas », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 96, n° 22, p. 1691-1702, nov. 2004.

[57] J. Wan, L. Sun, J. W. Mendoza, Y. L. Chui, D. P. Huang, Z. J. Chen, N. Suzuki, S. Suzuki, W.-C. Yeh, S. Akira, K. Matsumoto, Z.-G. Liu, et Z. Wu, « Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n° 1, p. 192-199, janv. 2004.

[58] A. G. Eliopoulos, N. J. Gallagher, S. M. Blake, C. W. Dawson, et L. S. Young, « Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 23, p. 16085-16096, juin 1999.

[59] S.-Y. Chen, J. Lu, Y.-C. Shih, et C.-H. Tsai, « Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase », *J. Virol.*, vol. 76, n° 18, p. 9556-9561, sept. 2002.

[60] X. Zhang, W. Uthaisang, L. Hu, I. T. Ernberg, et B. Fadeel, « Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependent mitochondrial perturbation », *Int. J. Cancer*, vol. 113, n° 3, p. 397-405, janv. 2005.

[61] X. Zhang, D. Sanmun, L. Hu, B. Fadeel, et I. Ernberg, « Epstein-Barr virus-encoded LMP1 promotes cisplatin-induced caspase activation through JNK and NF-kappaB signaling pathways », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 360, n° 1, p. 263-268, août 2007.

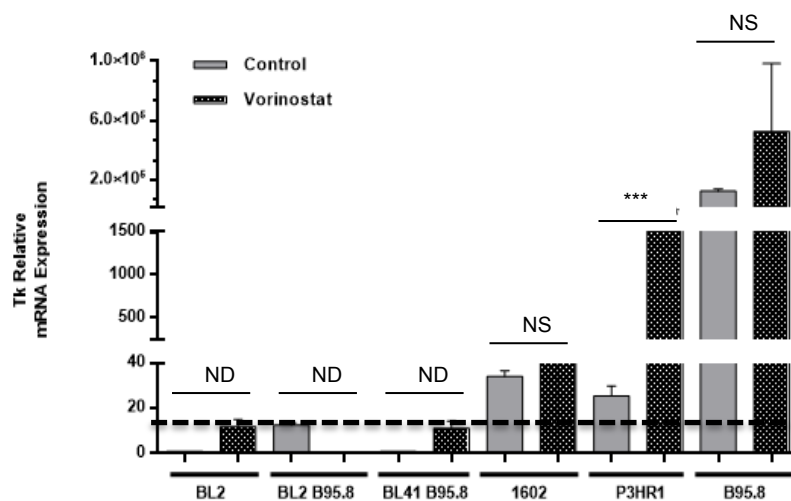
[62] C. Le clorennec, T. Ouk, I. Youlyouze-Marfak, et S. Panteix, « Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligan... - PubMed - NCBI », 30-avr-2008. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448526>. [Consulté le: 30-sept-2015].

[63] C. Le Clorennec, I. Youlyouze-Marfak, E. Adriaenssens, J. Coll, G. W. Bornkamm, et J. Feuillard, « EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53 », *Blood*, vol. 107, n° 5, p. 2070-2078, mars 2006.

- [64] L. Geng et X. Wang, « Epstein-Barr Virus-associated lymphoproliferative disorders: experimental and clinical developments », *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, n° 9, p. 14656-14671, sept. 2015.
- [65] M. H. Kirschbaum, B. H. Goldman, J. M. Zain, J. R. Cook, L. M. Rimsza, S. J. Forman, et R. I. Fisher, « A phase 2 study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Study S0517 », *Leuk. Lymphoma*, vol. 53, n° 2, p. 259-262, févr. 2012.
- [66] R. Chen, P. Frankel, L. Popplewell, T. Siddiqi, N. Ruel, A. Rotter, S. H. Thomas, M. Mott, N. Nathwani, M. Htut, A. Nademanee, S. J. Forman, et M. Kirschbaum, « A phase II study of vorinostat and rituximab for treatment of newly diagnosed and relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma », *Haematologica*, vol. 100, n° 3, p. 357-362, mars 2015.
- [67] M. H. Sadeghian, H. Ayatollahi, M. R. Keramati, B. Memar, S. A. Jamedar, M. M. Avval, M. Sheikhi, et G. Shaghayegh, « The association of Epstein-Barr virus infection with multiple myeloma », *Indian J. Pathol. Microbiol.*, vol. 54, n° 4, p. 720-724, déc. 2011.
- [68] K. Shirakawa, L. Chavez, S. Hakre, V. Calvanese, et E. Verdin, « Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors », *Trends Microbiol.*, vol. 21, n° 6, p. 277-285, juin 2013.
- [69] H. J. Shin, J. DeCotiis, M. Giron, D. Palmeri, et D. M. Lukac, « Histone deacetylase classes I and II regulate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation », *J. Virol.*, vol. 88, n° 2, p. 1281-1292, janv. 2014.

Figure 1:

A



B

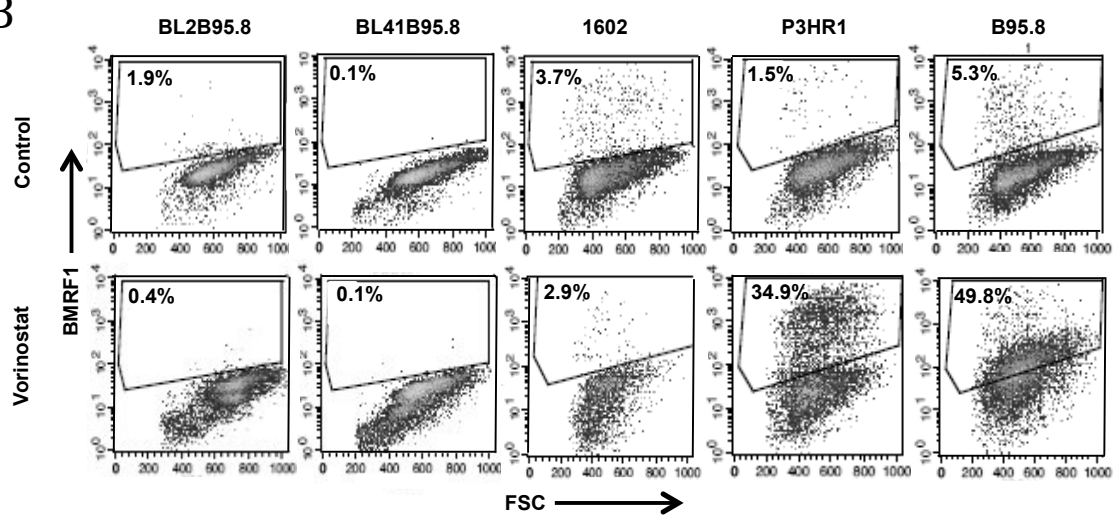


Figure 2:

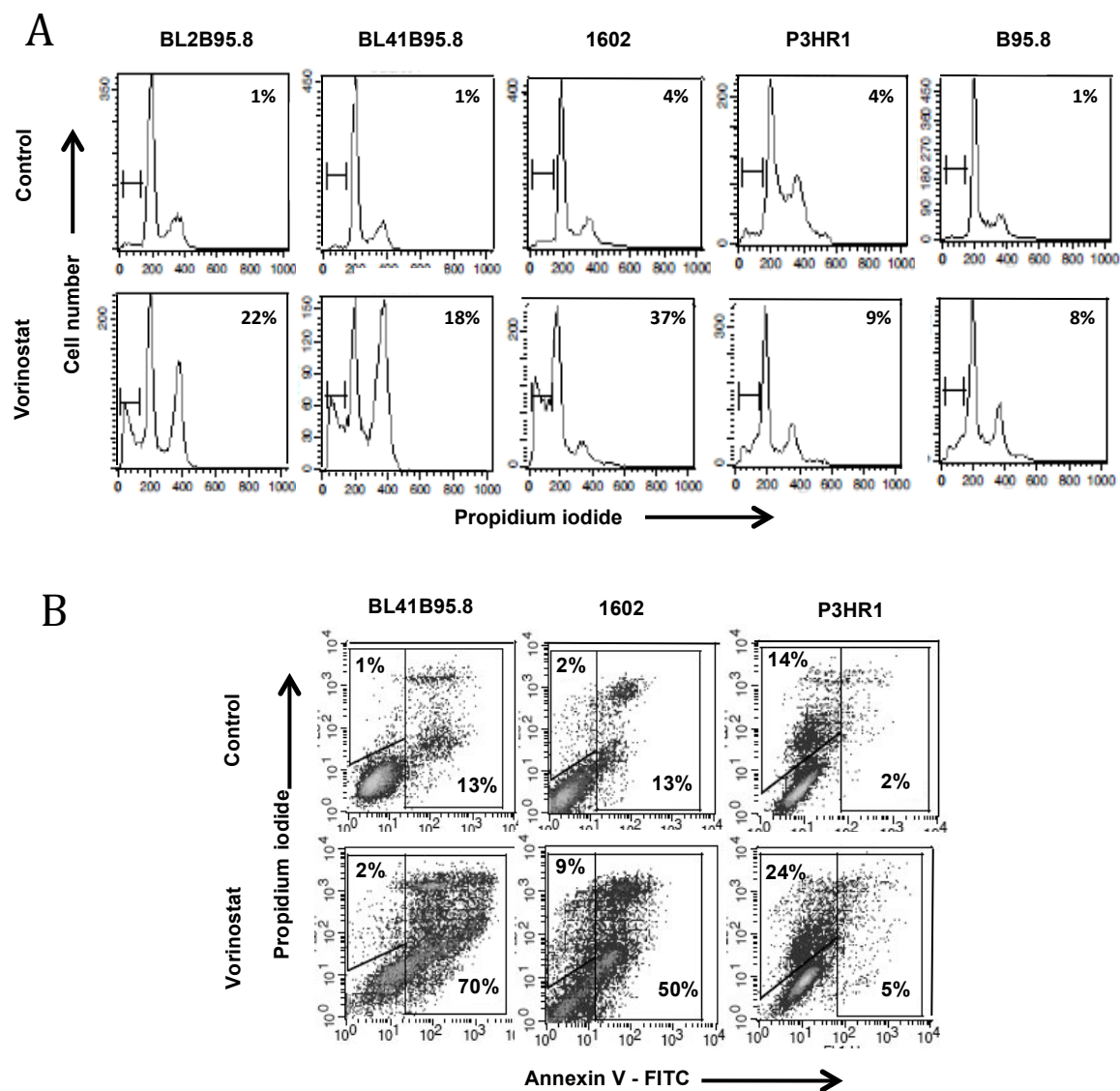


Figure 3:

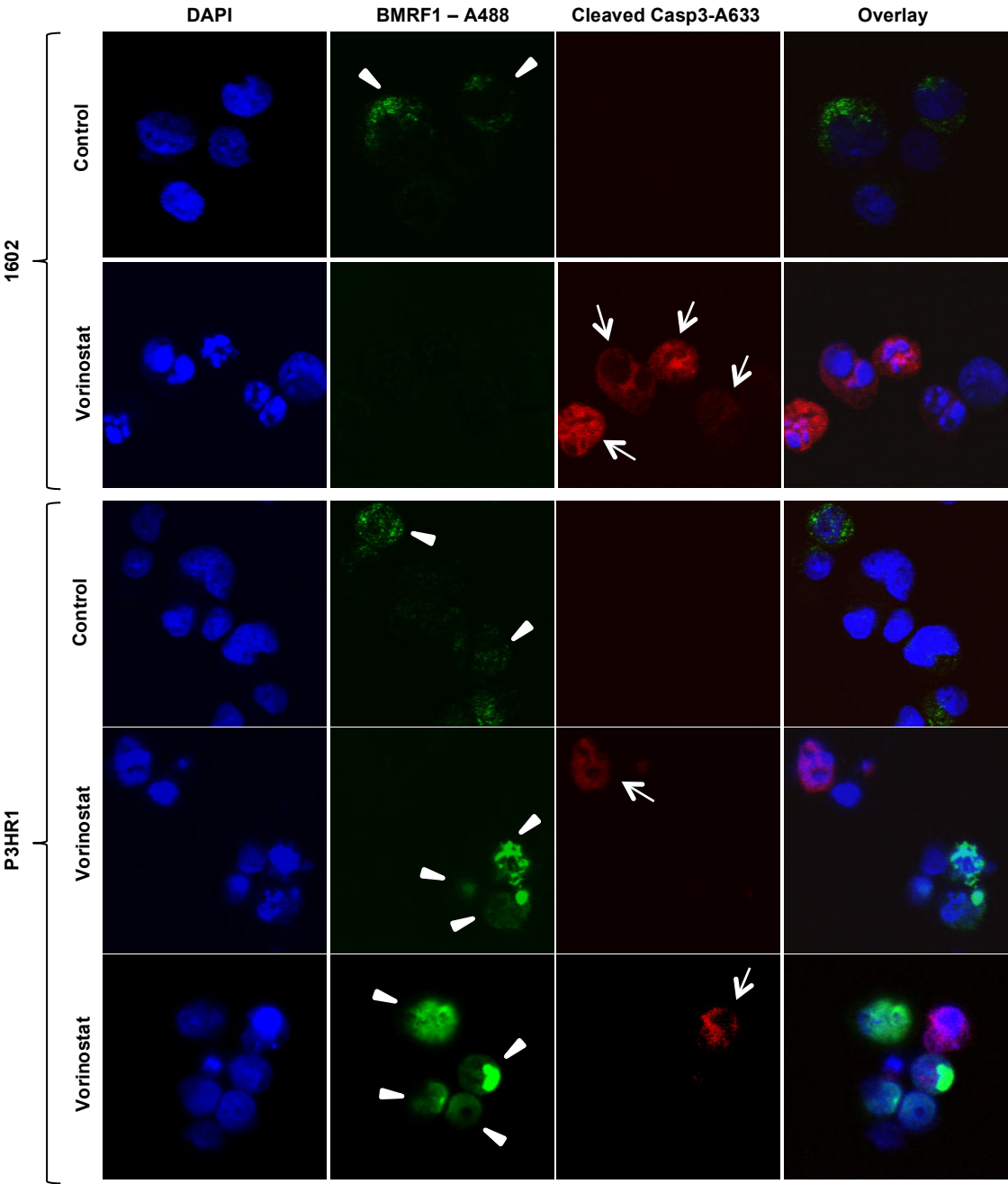


Figure 4:

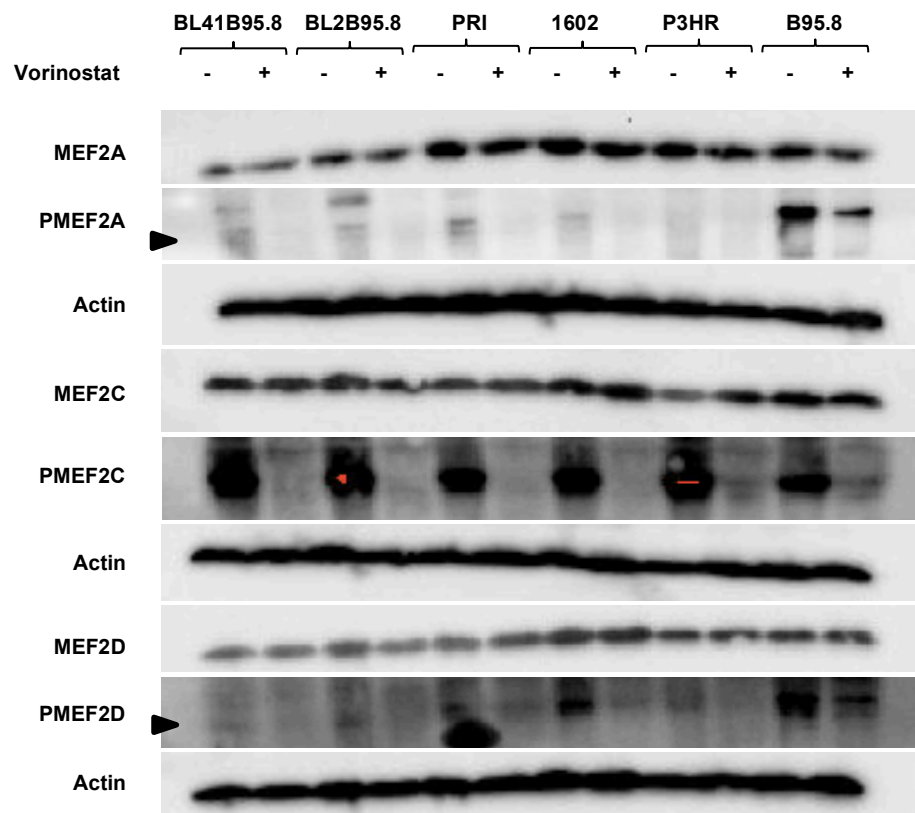


Figure 5:

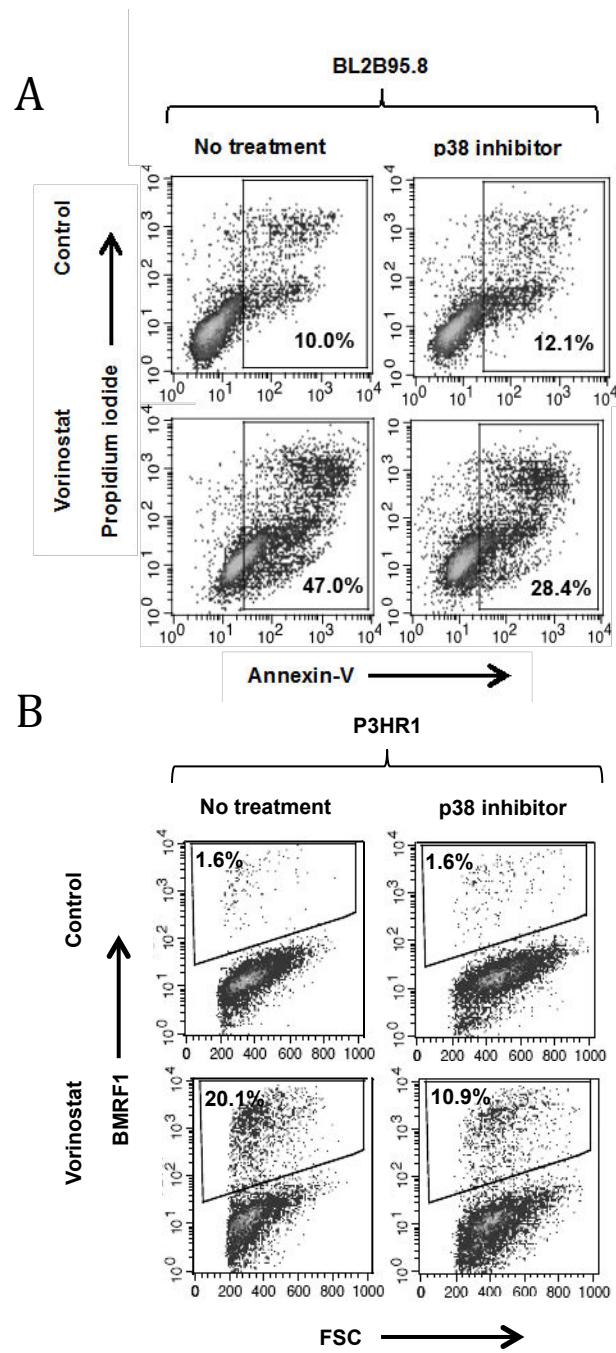
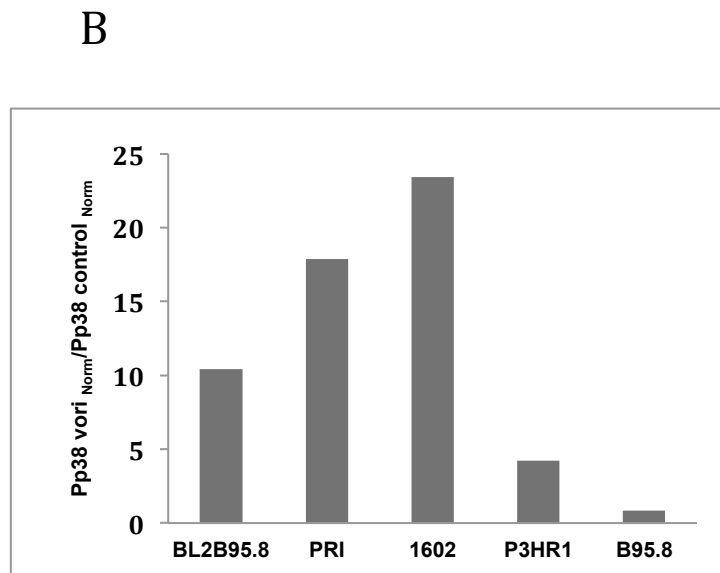
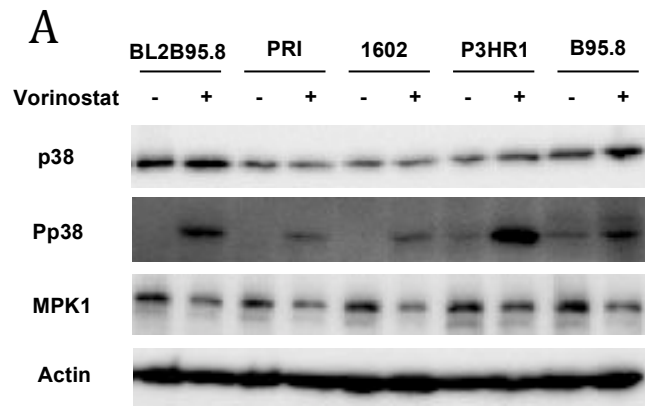


Figure 6:



CONCLUSIONS, DISCUSSION ET **PERSPECTIVES**

Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) sont décrits à la fois comme une classe prometteuse de molécules anticancéreuses et comme des agents potentiels de la réactivation de l'EBV. Parmi les HDACi, le vorinostat est proposé pour le traitement de cancers hématologiques pouvant être associés à l'EBV, comme certains lymphomes. Sachant que ce virus infecte de manière latente plus de 90% de la population adulte dans le monde, il est intéressant d'étudier l'effet de cette molécule sur des lignées de lymphomes B infectées par l'EBV. Pour ce faire, nous avons utilisé trois lignées humaines de lymphomes de Burkitt (BL41B95.8, BL2B95.8 et P3HR1), trois lignées de LCL (lymphoblastoid cell lines) : 1602, PRI et RUD, ainsi que la lignée B95.8 (cellules de marmouset infectées par la souche de référence de l'EBV B95.8). Cette dernière nous a servi de contrôle positif car elle est connue comme étant en cycle lytique. Nous avons traité les cellules par 25 μ M de vorinostat pendant 48 heures, ces conditions ayant été définies lors d'un test préalable au MTS comme permettant d'inhiber 50 % de la prolifération cellulaire (IC50) pour nos différentes lignées.

Nous avons pu montrer lors d'analyses par cytométrie en flux, suite au marquage de la protéine précoce du facteur de processivité de l'ADN polymérase (BMRF1) du cycle lytique, ainsi que par RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) du gène précoce de la thymidine kinase (TK) du cycle lytique de l'EBV, que ce virus est capable de se réactiver dans les lignées P3HR1 et B95.8, contrairement aux autres lignées étudiées. La prolifération étant inhibée pour ces dernières et les HDACi étant décrits dans la littérature comme pouvant également déclencher la signalisation apoptotique nous avons recherché si ce processus concernait les lignées pour lesquelles l'EBV n'était pas réactivé. Suite à l'analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire afin de rechercher le pic apoptotique sub-G1 et au test annexine V/iodure de propidium permettant de mettre en évidence l'externalisation des phosphatidylsérine lors des étapes précoces de l'apoptose, nous avons pu montrer que les lignées dans lesquelles l'EBV ne se réactive pas entrent en apoptose. Un double marquage par immunofluorescence du BMRF1 et de la caspase 3 clivée (caspase effectrice de la cascade apoptotique) nous a permis de montrer que l'apoptose induite passe par la voie des caspases et que les processus de réactivation et d'apoptose sont mutuellement exclusifs dans les lignées de lymphome B étudiées.

Lors de la réactivation l'EBV exprime les protéines du cycle lytique de manière séquentielle. Il y a tout d'abord expression des protéines très précoces : l'expression de ZEBRA active celle de Rta. Lorsque ces dernières sont exprimées elles activent l'expression des protéines précoces qui induisent la réplication du génome virale et sont nécessaires à la transcription

des gènes tardifs. Les produits tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation de particules virales infectieuses qui seront encapsidées dans le noyau et libérées par lyse des cellules hôtes.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'initiation de la réactivation de l'EBV par les HDACi ne sont pas très clairs. Nous nous sommes donc intéressés à ces derniers au cours du traitement par le vorinostat. Il est décrit dans la littérature que l'activation de l'expression du gène très précoce du cycle lytique BZLF1 codant pour la protéine ZEBRA est essentielle au déclenchement du cycle lytique mais les signaux conduisant à l'expression de ce gène sont complexes et demeurent flous. Flamand et al. ont décrit (1996) que le promoteur de ce gène est constitué de différents motifs et que la séquence appelée Zp minimale (numérotée de -221 à +12 pb par rapport au point de départ de la transcription) suffit à elle-même pour déclencher la réponse aux inducteurs chimiques (Flamand and Menezes, 1996). Les motifs de cette séquence permettent la fixation de facteurs activateurs ou inhibiteurs de la transcription du gène BZLF1. Parmi ces facteurs, Manet et al. ont décrit (2003) que durant la latence, le MEF2D (myocyte enhancer factor 2 D) se trouve bloqué par des HDAC de classe II au niveau du promoteur, inhibant l'expression du gène et par voie de conséquence la réactivation virale (Manet et al., 2003). Suite au traitement par des inducteurs de la réactivation, les HDAC II sont phosphorylées et le facteur MEF2D se déphosphoryle, conduisant ainsi à la libération du MEF2D et à l'expression de BZLF1. Les HDACi constituent une classe de molécules capables de bloquer les HDAC. Elles sont employées dans le traitement des cancers car elles permettent de lever la répression de gènes suppresseurs de tumeurs, d'inhibiteurs du cycle cellulaire, de facteurs de différenciation ou d'inducteurs de l'apoptose suite aux altérations d'expression ou de fonction des HDAC (Kelly et al., 2002). Certains HDACi spécifiques des HDAC de classe II, tel que le vorinostat, la trichostatine, le butyrate de sodium, le MS-275, l'apicidine ou le valproate peuvent libérer le MEF2D et induire le cycle lytique.

Les MEF2 constituent une famille de facteurs de transcription découverts à l'origine comme étant impliqués dans le développement des myocytes. Ils sont exprimés de manière ubiquitaire, y compris dans les cellules lymphocytaires. Cette famille de molécules est constituée de quatre membres (MEF2 A, B, C et D). MEF2 D et A ont été clairement décrits comme se fixant aux motifs ZI du promoteur de BZLF1 (Murata, 2014) (Manet et al., 2003). Suite à leurs travaux, Murata et al. (2014) ont toutefois discuté le fait qu'il est probable que tous les MEF2 soient capables de se lier au promoteur de BZLF1 et de contribuer à la réactivation virale (Murata, 2014).

Nous avons étudié par western blot l'effet du vorinostat sur l'expression et la phosphorylation des MEF2 A, C et D (il n'existe pas d'anticorps pour l'étude des MEF2B/MEF2B phosphorylés), afin de voir les conséquences du traitement par le vorinostat. Nous avons montré que les niveaux d'expression ne changent pas mais que les MEF2 A, C et D sont toujours déphosphorylés. Dans la mesure où il y a déphosphorylation des MEF2 (MEF2D en particulier) pour l'ensemble des lignées étudiées sans qu'il y ait systématiquement réactivation de l'EBV, il nous est apparu qu'une régulation encore plus en amont et d'influence plus importante était à l'origine de la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l'EBV lors du traitement par le vorinostat. La contribution des MEF2 A et C à la réactivation n'est pas très claire dans la littérature et il existe dans notre cas une déphosphorylation particulièrement importante du facteur MEF2C, il serait intéressant d'étudier sa contribution dans la réactivation virale en ce qui concerne nos modèles cellulaires. En effet, la baisse de phosphorylation lors du traitement par le vorinostat suggère que les MEF2C pourraient être également inhibés par des HDAC sensibles à cet inhibiteur (c'est-à-dire de classe II mais également possiblement de classes I et IV comme le vorinostat permet l'inhibition de l'ensemble de ces classes de HDAC). Pour ce faire, il est possible d'employer des siRNA permettant d'inhiber son expression et d'étudier l'expression des gènes très précoces et précoces (expression du gène TK par RT-QPCR et des protéines ZEBRA et BMRF1 par cytométrie en flux par exemple).

L'activation de la MAP kinase pro apoptotique p38 nous est apparue comme pouvant être un facteur susceptible d'être responsable de l'orientation des cellules vers l'apoptose ou vers la réactivation de l'EBV lors du traitement par le vorinostat.

Le vorinostat est décrit dans la littérature comme étant impliqué dans la réactivation de l'EBV. L'utilisation de siRNA ciblant p38 ou l'inhibition des ROS (pouvant induire p38) ou de l'activation de p38 induite par le nocodazole conduit à la baisse de l'expression de ZEBRA ou de Rta dans les cellules épithéliales (Gao et al., 2004) (Liu et al., 2013) (Huang et al., 2013). De plus, l'inhibition de p38 empêche fortement l'expression des gènes lytiques dans les cellules de lymphomes B, ainsi que l'induction de la réactivation par le méthotrexate dans des lignées lymphoblastoïdes et des lignées cellulaires de carcinome gastrique (Matusali et al., 2009) (Feng et al., 2004).

Par ailleurs, les iHDAC sont connues pour être générateurs d'espèces oxygénées réactives (ROS) dont l'accumulation peut déclencher l'apoptose (Rosato et al., 2003) (Rosato et al., 2006) (Marks, 2006). Les cellules tumorales sont de plus considérées comme étant plus

sensibles que les cellules normales, suite à l'augmentation de l'expression de la TBP-2 (TRX Binding Protein-2) qui est un inhibiteur de la thiorédoxine (molécule permettant de piéger les ROS) (Ungerstedt et al., 2005) (Dokmanovic and Marks, 2005). Les ROS ont été décrits comme jouant un rôle central dans la mort des cellules par apoptose suite au traitement par le vorinostat en permettant de conduire au clivage de Bid et à l'induction de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale (Ruefli et al., 2001). Il a été montré que le pré-traitement par les piègeurs des ROS, tel que la N-acétyl cystéine (NAC) diminue l'apoptose induite par les HDACi (Ruefli et al., 2001) (Yu et al., 2007) (Yoshioka et al., 2013) (Zhu et al., 2014).

p38 est une MAP kinase pro-apoptotique dont l'activation est très sensible au stress oxydatif (Son et al., 2011). De même qu'il a été rapporté au cours des traitements par les HDACi, elle conduit à la modification de l'expression et/ou de l'activité de nombreuses protéines de la famille Bcl-2 (Porras and Guerrero, 2010). Il a été montré que les traitements par les HDACi pouvaient provoquer la baisse de l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl2 ou Bcl-X_L et l'augmentation de l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que Bim, Bmf, Bad, Bid, Noxa, Puma, Bax ou Bak (Gillenwater et al., 2007) (Iacomino et al., 2008) (Bai et al., 2011) (Zhao et al., 2005) (Xu et al., 2006) (Matthews et al., 2012).

L'inhibition de p38 par un inhibiteur chimique nous a permis de montrer, suite à un test d'apoptose annexine V/iodure de propidium, en parallèle du marquage de la protéine précoce de réactivation BMRF1, que le pourcentage des cellules apoptotiques diminuait, de même que celui de cellules entrant en cycle lytique. Ceci a permis de mettre en évidence le rôle de p38 dans les processus de réactivation ainsi que d'apoptose lors du traitement par le vorinostat. La MAP kinase proapoptotique JNK peut également être induite par le stress oxydatif (Son et al., 2011) mais son inhibition chimique ne nous a pas permis de mettre en évidence son implication dans la réactivation ou l'apoptose (ces résultats n'ont pas été inclus dans la publication). Il serait intéressant de voir l'effet du vorinostat sur la MAP kinase anti-apoptotique ERK dont l'expression varie souvent en sens inverse de p38. Il est possible d'employer un inhibiteur chimique et de voir si cela conduit à une diminution du pourcentage de cellules entrant en apoptose et à une augmentation éventuelle du taux de celles entrant en cycle lytique.

L'analyse de la MAP kinase pro-apoptotique p38 par western blot a permis de montrer que son niveau d'expression n'est pas modifié suite au traitement par le vorinostat mais que sa phosphorylation est toujours augmentée. Cette augmentation est concomitante de l'augmentation d'expression de la phosphatase MPK1 dont p38 est un substrat. Contrairement

à ce que nous observons dans les lignées lymphocytaires B, le traitement par le vorinostat a été décrit comme conduisant à la diminution de l'expression de MPK1 et de la phosphorylation de p38 dans des cellules de type fibroblastique (Choo et al., 2013). L'activation de p38 peut être favorable à l'entrée du virus en réactivation mais est également susceptible de conduire les cellules en apoptose.

Nous avons de plus pu montrer que les cellules qui entrent en apoptose plutôt qu'en réactivation présentent une très forte augmentation de l'activation de p38 par rapport à leur niveau basal, suite au traitement par le vorinostat.

De manière à préciser l'effet du vorinostat sur l'activation de p38 et le rôle éventuel des ROS, il serait possible de traiter les cellules par un inhibiteur des ROS tel que la NAC, de marquer ces derniers par une sonde fluorescente comme le DCFDA et d'en évaluer la présence par cytométrie en flux. Il serait également intéressant de voir par western blot si le niveau d'expression de TBP-2 est augmenté.

Nous avons pu montrer que l'apoptose induite par le vorinostat est associée à p38. Cette MAP kinase peut modifier le niveau d'expression de nombreuses molécules de la famille Bcl2 intervenant dans l'apoptose intrinsèque et déjà décrite comme pouvant être modulées par les iHDAC. Afin de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'entrée en apoptose de nos cellules il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl2 et Bcl-X_L et de molécules pro-apoptotiques comme Bax, Bad ou Bim. Il serait également intéressant d'étudier la relocalisation de Bax à la mitochondrie. En effet, cette molécule est un substrat de p38 et sa phosphorylation conduit à sa relocalisation au niveau de la membrane de cet organe et à l'ouverture des pores mitochondriaux, ce qui permet le relargage du cytochrome c et la constitution de l'apoptosome permettant l'activation de la caspase 9 initiateur (Hongmei, 2012).

Nous avons pu montrer que l'apoptose induite dépendait des caspases, avec l'activation de la caspase 3 effectrice. Or, cette dernière est également activée dans le cas de l'apoptose extrinsèque et il est décrit dans la littérature que les iHDAC peuvent être impliquées dans l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Les HDACi sont particulièrement connus pour augmenter l'expression des récepteurs de type TRAIL-R et de leurs ligands TRAIL (Lagneaux et al., 2007) (Carlisi et al., 2009) (VanOosten et al., 2005). Il serait intéressant de voir si dans nos modèles cellulaires l'expression de ces derniers est augmentée. Par ailleurs, p38 est également décrit comme pouvant être à l'origine de la surexpression de FAS et de FASL, or la surexpression de FAS peut conduire à son auto-activation et à l'apoptose par la

voie extrinsèque avec activation de la caspase 8, comme nous avons pu le démontrer suite à la surexpression de LMP1. Il est possible que ces deux processus pro-apoptotiques co-existent dans nos modèles cellulaires. De plus, le clivage de Bid par la caspase 8 permet sa relocalisation au niveau de la mitochondrie et l'activation de la voie intrinsèque, et ce dernier a déjà été décrit lors de traitements par les HDACi (Matthews et al., 2012). Il pourrait servir de boucle d'amplification de l'apoptose.

Nos résultats mettant en évidence qu'une augmentation importante de l'activation de p38 conduit à l'apoptose plutôt qu'à l'entrée en cycle lytique des cellules peut toutefois dépendre de la nature des lignées étudiées (entrée en apoptose des lignées de type BL et LCL et différence entre la souche de référence B95.8 et celle infectant les P3HR1). Cependant, l'étude d'autres HDACi s'associant aux HDAC de classe II a montré que le butyrate permet la réactivation virale chez les cellules P3HR1 et BL alors que le valproate est seulement efficace pour la lignée P3HR, suggérant une efficacité dépendante de l'HDACi employé et non des lignées BL et P3HR1 (Daigle et al., 2011) (Ghosh et al., 2012) (Gorres et al., 2016). Par ailleurs, le MS-275 ou l'apicidine peuvent déclencher la réactivation de l'EBV pour une gamme de concentration donnée. A des doses plus élevées il est observé une baisse plus importante de la croissance cellulaire mais également une baisse de la réactivation (Ghosh et al., 2012). Ceci met en évidence un autre mécanisme associé à la mort cellulaire qui pourrait être l'apoptose, suite à une trop forte accumulation des ROS et à une forte activation de p38. Afin de répondre à cette question dans le cas de nos lignées nous avons traité les cellules P3HR1 et B95.8 par des doses croissantes de vorinostat. Nos résultats préliminaires montrent qu'à de fortes doses de drogue les cellules entrent en apoptose et non en réactivation. Il reste à vérifier si la mort par apoptose s'accompagne d'une augmentation importante de la phosphorylation de p38 et peut être attribuée à un effet dose/réponse du vorinostat (avec entrée des cellules en cycle lytique pour un niveau faible d'activation de p38 et entrée en apoptose lors d'une forte augmentation de l'activation de cette MAP kinase).

Il serait intéressant d'élargir notre étude concernant le rôle de p38 dans régulation de la balance réactivation/apoptose par le vorinostat à un plus grand nombre de lignées cellulaires, en particulier à d'autres lignées tumorales de type B correspondant à des lymphomes possiblement associés à l'EBV, telles que les SUDHL4 ou les SUDHL6 (lignées de type DLBCL, Diffuse Large B cell Lymphoma). L'étude pourrait également être menée sur des cellules de lymphomes NK (lignées MEC04 et SNK6). Ces dernières sont connues pour être

très difficiles à réactiver et des analyses préliminaires nous ont montré qu'elles entraînent en apoptose.

Il existe un grand nombre de HDACi, autres que le vorinostat, s'associant aux HDAC de classe II, tels que la trichostatine, le butyrate de sodium, le MS-275, l'apicidine ou le valproate. Dans la mesure où il a déjà été rapporté dans la littérature des spécificités de réactivation de l'EBV en fonction des lignées cellulaires et des HDACi testées il serait intéressant d'étudier leur impact sur l'activation de p38 et leur rôle éventuel sur la balance réactivation/apoptose.

Par ailleurs, le rôle des différentes classes de HDAC dans la régulation de la réactivation de l'EBV est encore flou. Alors que l'inhibition de la réactivation de l'EBV est généralement associée aux HDAC de classe II (HDAC4, 5, 6 7 et 9), l'inhibition des HDAC1, 2 et 3 (de classe I) par des inhibiteurs sélectifs (romidepsine, MS-275 ou apicidine) ou à l'aide de shRNA permet d'induire le cycle lytique de l'EBV dans les cellules NPC (nasopharyngeal carcinoma) et GC (gastric carcinoma) (Hui and Chiang, 2015) (Hui et al., 2016). De plus, la surexpression de l'HDAC2 permet de supprimer la réactivation du cycle lytique par des HDACi dans les cellules NPC (Tsai et al., 2011). Il est intéressant de noter que les HDAC2 et 3 sont également importantes dans le contrôle de la réactivation d'autres virus latents tels que le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et le KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) (Barton et al., 2014) (Shin et al., 2014). Il a de plus été observé que les HDAC2 et 3 sont surexprimées dans les cellules épithéliales EBV positives par rapport aux cellules lymphoïdes EBV positives, ce qui pourrait contribuer à expliquer pourquoi elles sont plus sensibles à la réactivation du cycle lytique de l'EBV lors du traitement par des HDACi inhibant simultanément plusieurs classes de HDAC, comme le vorinostat (inhibition des classe I, II et IV) (Hui and Chiang, 2010) (Hui et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer, à l'aide de shRNA par exemple, si l'inhibition d'autres HDAC que les HDACII peuvent contribuer à induire le cycle lytique dans nos modèles cellulaires.

Il est généralement admis que le cycle de vie de l'EBV met en jeu les phases lytiques et latentes. Cependant, les voies apoptotiques sont souvent engagées lors de l'infection par l'EBV, même sans traitement par un agent exogène. Il existe un équilibre entre la latence et l'apoptose. Pendant la latence II ou III, l'expression des protéines membranaires de latence LMP1 et LMP2A conduit à l'activation constitutive des MAP kinases pro-apoptotiques p38 et/ou JNK (JNK et p38 pour LMP1, JNK pour LMP2A) (Wan et al., 2004) (Eliopoulos et al., 1999) (Chen et al., 2002). La protéine LMP1 peut induire des perturbations au niveau des

mitochondries et conduire à la libération du cytochrome c et à l'activation de la cascade de caspases (Zhang et al., 2005) (Zhang et al., 2007). LMP1 est également à l'origine de la surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas / CD95 à la surface cellulaire, ce qui peut induire son auto-activation et l'apoptose dans le cas des cellules B en latence III, comme nous l'avons déjà démontré dans des travaux précédents du laboratoire . La surexpression de Fas est par ailleurs à l'origine de la sensibilisation des cellules en latence III à leur mort par apoptose lors de leur interaction avec les cellules T cytotoxiques exprimant FasL. Notre travail suggère qu'il peut également se mettre en place un équilibre entre la réactivation et l'apoptose en fonction du niveau d'activation de p38 au sein des cellules stimulées pour entrer en cycle lytique. L'homéostasie du compartiment cellulaire B infectés par l'EBV pourrait ainsi être régulée *in vivo* par un équilibre entre trois états majeurs : la latence, la réactivation et l'apoptose.

L'EBV est associé à de nombreux cancers et désordres hématologiques, tels que les lymphomes (Young et al., 2000). Les HDACi sont pressenties comme des molécules anticancéreuses d'intérêt pour le traitement de différents types de cancer dont les hémopathies malignes (Ververis et al., 2013) (Duvic and Dimopoulos, 2016). En 2006, la FDA (Food and Drug Administration) a donné son accord pour le traitement du syndrome lymphoprolifératif CTCL (lymphome cutané à cellules T) par le vorinostat (commercialisé sous le nom de Zolinza®, Merck & Co, Inc.). Ce lymphome peut être associé à l'EBV (Novelli et al., 2009) (Rodríguez-Pinilla et al., 2010). Le vorinostat a également été exploré et proposé pour le traitement d'autres lymphomes associés à l'EBV (Duvic and Dimopoulos, 2016) (Geng and Wang, 2015), dont les myélomes multiples (MM), les lymphomes non hodgkiniens (LNH) ou le lymphome de Hodgkin (Kirschbaum et al., 2012) (Chen et al., 2015) (Sadeghian et al., 2011). Notre travail pose la question de la réactivation de l'EBV lors du traitement par les HDACi et de la libération possible de virions en grande quantité dans l'organisme, y compris pour d'autres virus dont la réactivation est sensible aux HDACi ciblant les HDAC de classe II, comme le VIH (Shirakawa et al., 2013) ou un autre virus à forte prévalence, tel que le KSHV (Shin et al., 2014). Dans la mesure où il reste difficile de contrôler le niveau d'activation de p38 au sein des cellules, l'utilisation simultanée d'un antiviral tel que le ganciclovir pendant les traitements chimio-thérapeutiques associant des HDACi semble être appropriée. Le ganciclovir, suite à sa phosphorylation par une kinase exprimée durant le cycle lytique (telles que BGFL4 dans le cas de l'EBV) puis à sa double phosphorylation par une kinase cellulaire peut être incorporée dans les brins d'ADN en cours de réplication et causer

un arrêt prématuré de sa synthèse, conduisant ainsi les cellules infectées à l'apoptose, ce qui permet d'éviter le relargage de virions dans l'organisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A.B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* *64*, 2126–2134.
- Adams, A., and Lindahl, T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 1477–1481.
- Adamson, A.L., and Kenney, S. (1999). The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J. Virol.* *73*, 6551–6558.
- Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J., and Kenney, S. (2000). Epstein-Barr Virus Immediate-Early Proteins BZLF1 and BRLF1 Activate the ATF2 Transcription Factor by Increasing the Levels of Phosphorylated p38 and c-Jun N-Terminal Kinases. *J. Virol.* *74*, 1224–1233.
- Adriaenssens, E., Mougél, A., Goormachtigh, G., Loing, E., Fafeur, V., Auriault, C., and Coll, J. (2004). A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. *Oncogene* *23*, 2681–2693.
- Ai, T., Xu, Y., Qiu, L., Geraghty, R.J., and Chen, L. (2015). Hydroxamic acids block replication of hepatitis C virus. *J. Med. Chem.* *58*, 785–800.
- Al Tabaa, Y., Tuaillon, E., Bollore, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J.-M., Duperray, C., Desgranges, C., and Vendrell, J.-P. (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* *113*, 604–611.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* *181*, 595–608.
- Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2007). Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell* *26*, 301–310.
- Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* *276*, 6063–6073.
- Allan, G.J., Inman, G.J., Parker, B.D., Rowe, D.T., and Farrell, P.J. (1992). Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J. Gen. Virol.* *73* (Pt 6), 1547–1551.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., and Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* *5*, 647–654.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* *87*, 171.
- Altmann, M., and Hammerschmidt, W. (2005). Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis. *PLoS Biol.* *3*.

- d'Amore, F., Johansen, P., Houmand, A., Weisenburger, D.D., and Mortensen, L.S. (1996). Epstein-Barr virus genome in non-Hodgkin's lymphomas occurring in immunocompetent patients: highest prevalence in nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis. Danish Lymphoma Study Group, LYFO. *Blood* 87, 1045–1055.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744–750.
- Angelov, D., Vitolo, J.M., Mutskov, V., Dimitrov, S., and Hayes, J.J. (2001). Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6599–6604.
- Armeanu, S., Pathil, A., Venturelli, S., Mascagni, P., Weiss, T.S., Göttlicher, M., Gregor, M., Lauer, U.M., and Bitzer, M. (2005). Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J. Hepatol.* 42, 210–217.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily : Abstract : Nature Reviews Cancer.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- van Baarle, D., Hovenkamp, E., Callan, M.F., Wolthers, K.C., Kostense, S., Tan, L.C., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D., McMichael, A.J., van Oers, M.H., et al. (2001). Dysfunctional Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8(+) T lymphocytes and increased EBV load in HIV-1 infected individuals progressing to AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 98, 146–155.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Séguin, C., et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. *Nature* 310, 207–211.
- Bai, L.-Y., Omar, H.A., Chiu, C.-F., Chi, Z.-P., Hu, J.-L., and Weng, J.-R. (2011). Antitumor effects of (S)-HDAC42, a phenylbutyrate-derived histone deacetylase inhibitor, in multiple myeloma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 489–496.
- Banerjee, A.S., Pal, A.D., and Banerjee, S. (2013). Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* 443, 294–305.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103–1106.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 Type I/Type II model. *Semin. Immunol.* 15, 185–193.
- Baron, S. (1996). Medical Microbiology, 4th edition- NCBI Bookshelf (The University of

Texas Medical Branch at Galveston.: Samuel Baron).

Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehse, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäger, C., Höck, J., Meister, G., and Grässer, F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* 36, 666–675.

Batisse, J., Manet, E., Middeldorp, J., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2005). Epstein-Barr Virus mRNA Export Factor EB2 Is Essential for Intranuclear Capsid Assembly and Production of gp350. *J. Virol.* 79, 14102–14111.

Bauer, G. (1983). Induction of epstein-barr virus early antigens by corticosteroids: Inhibition by TPA and retinoic acid. *Int. J. Cancer* 31, 291–295.

Beagley, K.W., and Gockel, C.M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 13–22.

Bechtel, J., Grundhoff, A., and Ganem, D. (2005). RNAs in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J. Virol.* 79, 10138–10146.

Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000935.

Bereshchenko, O.R., Gu, W., and Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat. Genet.* 32, 606–613.

Berger, S.L. (2001). Molecular biology. The histone modification circus. *Science* 292, 64–65.

Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.

Bertos, N.R., Wang, A.H., and Yang, X.J. (2001). Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 79, 243–252.

Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.-J., and Kenney, S.C. (2004). The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat. Genet.* 36, 1099–1104.

Bhende, P.M., Dickerson, S.J., Sun, X., Feng, W.-H., and Kenney, S.C. (2007). X-Box-Binding Protein 1 Activates Lytic Epstein-Barr Virus Gene Expression in Combination with Protein Kinase D. *J. Virol.* 81, 7363–7370.

Billaud, M., Calender, A., Seigneurin, J.M., and Lenoir, G.M. (1987). LFA-1, LFA-3, and ICAM-1 expression in Burkitt's lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1327–1328.

Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784.

Borghi, S., Molinari, S., Razzini, G., Parise, F., Battini, R., and Ferrari, S. (2001). The nuclear

localization domain of the MEF2 family of transcription factors shows member-specific features and mediates the nuclear import of histone deacetylase 4. *J. Cell Sci.* 114, 4477–4483.

Borisch, B., Finke, J., Hennig, I., Delacr  ataz, F., Schneider, J., Heitz, P.U., and Laissue, J.A. (1992). Distribution and localization of Epstein–Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue of HIV-positive patients. *J. Pathol.* 168, 229–236.

Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (1998). Epstein-Barr Virus Recombinant Lacking Expression of Glycoprotein gp150 Infects B Cells Normally but Is Enhanced for Infection of Epithelial Cells. *J. Virol.* 72, 7577–7582.

Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 8, 594–599.

Bresnahan, W.A., and Shenk, T. (2000). A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 288, 2373–2376.

Brink, A.A., ten Berge, R.L., van den Brule, A.J., Willemze, R., Chott, A., and Meijer, C.J. (2000). Epstein-Barr virus is present in neoplastic cytotoxic T cells in extranodal, and predominantly in B cells in nodal T non-Hodgkin lymphomas. *J. Pathol.* 191, 400–406.

Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C817–833.

Brown, H.J., Song, M.J., Deng, H., Wu, T.-T., Cheng, G., and Sun, R. (2003). NF-  B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *J. Virol.* 77, 8532–8540.

Bryant, H., and Farrell, P.J. (2002). Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J. Virol.* 76, 10290–10298.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269–290.

Buettner, M., Lang, A., Tudor, C.S., Meyer, B., Cruchley, A., Barros, M.H.M., Farrell, P.J., Jack, H.-M., Schuh, W., and Niedobitek, G. (2012). Lytic Epstein-Barr virus infection in epithelial cells but not in B-lymphocytes is dependent on Blimp1. *J. Gen. Virol.* 93, 1059–1064.

Burgess, A., Ruefli, A., Beamish, H., Warrener, R., Saunders, N., Johnstone, R., and Gabrielli, B. (2004). Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene* 23, 6693–6701.

Burgess, A.J., Pavey, S., Warrener, R., Hunter, L.J., Piva, T.J., Musgrove, E.A., Saunders, N., Parsons, P.G., and Gabrielli, B.G. (2001). Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 60, 828–837.

- Butler, L.M., Agus, D.B., Scher, H.I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H.T., Rifkind, R.A., Marks, P.A., and Richon, V.M. (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 60, 5165–5170.
- Butler, L.M., Zhou, X., Xu, W.-S., Scher, H.I., Rifkind, R.A., Marks, P.A., and Richon, V.M. (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11700–11705.
- Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., and Cullen, B.R. (2006). Epstein–Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed. *PLoS Pathog* 2, e23.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405–411.
- Callan, M.F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G.S., Wilson, J.D., O’Callaghan, C.A., Steven, N., McMichael, A.J., and Rickinson, A.B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J. Exp. Med.* 187, 1395–1402.
- Candido, E.P., Reeves, R., and Davie, J.R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14, 105–113.
- Cao, X.X., Mohuiddin, I., Ece, F., McConkey, D.J., and Smythe, W.R. (2001). Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 562–568.
- Carbone, A., Gloghini, A., and Dotti, G. (2008). EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *The Oncologist* 13, 577–585.
- Carew, J.S., Giles, F.J., and Nawrocki, S.T. (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett.* 269, 7–17.
- Carlisi, D., Lauricella, M., D’Anneo, A., Emanuele, S., Angileri, L., Di Fazio, P., Santulli, A., Vento, R., and Tesoriere, G. (2009). The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 45, 2425–2438.
- Carrozza, M., Li, B., and Florens, L. (2005). Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription.
- Caslini, C., Capo-chichi, C.D., Roland, I.H., Nicolas, E., Yeung, A.T., and Xu, X.-X. (2006). Histone modifications silence the GATA transcription factor genes in ovarian cancer. *Oncogene* 25, 5446–5461.

- Castle, V.P., Heidelberger, K.P., Bromberg, J., Ou, X., Dole, M., and Nuñez, G. (1993). Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am. J. Pathol.* *143*, 1543–1550.
- Chang, L.-K., Chung, J.-Y., Hong, Y.-R., Ichimura, T., Nakao, M., and Liu, S.-T. (2005). Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein–Barr virus via an interaction with MCAF1. *Nucleic Acids Res.* *33*, 6528–6539.
- Chang, P.J., Chang, Y.S., and Liu, S.T. (1998). Characterization of the BcLF1 promoter in Epstein-Barr virus. *J. Gen. Virol.* *79*, 2003–2006.
- Chen, L.-F., and Greene, W.C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *81*, 549–557.
- Chen, C.-C., Yang, Y.-C., Wang, W.-H., Chen, C.-S., and Chang, L.-K. (2011). Enhancement of Zta-activated lytic transcription of Epstein-Barr virus by Ku80. *J. Gen. Virol.* *92*, 661–668.
- Chen, H., Lee, J.M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M.H., Ambinder, R.F., and Hayward, S.D. (2001). Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J. Virol.* *75*, 2929–2937.
- Chen, H., Hutt-Fletcher, L., Cao, L., and Hayward, S.D. (2003). A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *77*, 4139–4148.
- Chen, H.P., Zhao, Y.T., and Zhao, T.C. (2015). Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit. Rev. Oncog.* *20*, 35–47.
- Chen, Y., Shu, W., Chen, W., Wu, Q., Liu, H., and Cui, G. (2007). Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *101*, 427–433.
- Chen Lf, null, Fischle, W., Verdin, E., and Greene, W.C. (2001). Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* *293*, 1653–1657.
- Cheung, R.K., Miyazaki, I., and Dosch, H.M. (1993). Unexpected patterns of Epstein-Barr virus gene expression during early stages of B cell transformation. *Int. Immunol.* *5*, 707–716.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* *5*, 3243–3249.
- Chevallier-Greco, A., Gruffat, H., Manet, E., Calender, A., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J. Virol.* *63*, 615–623.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*

81, 505–512.

Chinnaiyan, P., Varambally, S., Tomlins, S.A., Ray, S., Huang, S., Chinnaiyan, A.M., and Harari, P.M. (2006). Enhancing the antitumor activity of ErbB blockade with histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Int. J. Cancer* 118, 1041–1050.

Choo, Q.-Y., Ho, P., Tanaka, Y., and Lin, H.-S. (2013). The Histone Deacetylase Inhibitors MS-275 and SAHA Suppress the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway and Chemotaxis in Rheumatoid Arthritic Synovial Fibroblastic E11 Cells. *Molecules* 18, 14085–14095.

Chopin, V., Slomianny, C., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2004). Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by cotreatment with butyrate and TNF- α , TRAIL, or anti-Fas agonist antibody involves enhancement of death receptors' signaling and requires P21(waf1). *Exp. Cell Res.* 298, 560–573.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13944–13949.

Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., and Mahadevan, L.C. (2006). Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol. Cell* 23, 289–296.

Cliffe, A.R., Nash, A.A., and Dutia, B.M. (2009). Selective uptake of small RNA molecules in the virion of murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 83, 2321–2326.

Cohen, J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343, 481–492.

Cohen, J.I., and Lekstrom, K. (1999). Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J. Virol.* 73, 7627–7632.

Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 13, 627–638.

Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr Virus Nuclear Protein 2 is a Key Determinant of Lymphocyte Transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9558–9562.

Cohen, L.A., Amin, S., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Desai, D., and Richon, V.M. (1999). Chemoprevention of carcinogen-induced mammary tumorigenesis by the hybrid polar cytodifferentiation agent, suberanilohydroxamic acid (SAHA). *Anticancer Res.* 19, 4999–5005.

Cohen, L.A., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Amin, S., Desai, D., Pittman, B., and Richon, V.M. (2002). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase inhibitor, suppresses the growth of carcinogen-induced mammary tumors. *Anticancer Res.* 22, 1497–1504.

- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G.M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* *64*, 1002–1013.
- Cox, M.A., Leahy, J., and Hardwick, J.M. (1990). An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J. Virol.* *64*, 313–321.
- Crawford, D.H., Swerdlow, A.J., Higgins, C., McAulay, K., Harrison, N., Williams, H., Britton, K., and Macsween, K.F. (2002). Sexual History and Epstein-Barr Virus Infection. *J. Infect. Dis.* *186*, 731–736.
- Crook, T., Nicholls, J.M., Brooks, L., O’Nions, J., and Allday, M.J. (2000). High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* *19*, 3439–3444.
- Daigle, D., Megyola, C., El-Guindy, A., Gradoville, L., Tuck, D., Miller, G., and Bhaduri-McIntosh, S. (2010). Upregulation of STAT3 marks Burkitt lymphoma cells refractory to Epstein-Barr virus lytic cycle induction by HDAC inhibitors. *J. Virol.* *84*, 993–1004.
- Darr, C.D., Mauser, A., and Kenney, S. (2001). Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BRLF1 Induces the Lytic Form of Viral Replication through a Mechanism Involving Phosphatidylinositol-3 Kinase Activation. *J. Virol.* *75*, 6135–6142.
- Davies, M.L., Xu, S., Lyons-Weiler, J., Rosendorff, A., Webber, S.A., Wasil, L.R., Metes, D., and Rowe, D.T. (2010). Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology* *400*, 53–67.
- Dawson, C.W., Dawson, J., Jones, R., Ward, K., and Young, L.S. (1998). Functional Differences between BHRF1, the Epstein-Barr Virus-Encoded Bcl-2 Homologue, and Bcl-2 in Human Epithelial Cells. *J. Virol.* *72*, 9016–9024.
- Deamant, F.D., Albújar, P.F., Chen, Y.Y., and Weiss, L.M. (1993). Epstein-Barr virus distribution in nonneoplastic lymph nodes. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *6*, 729–732.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hocheplied, T., Ovaere, P., and Declercq, W. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss : Article : *Nature Cell Biology*.
- Deroanne, C.F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clausse, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J.-M., Nusgens, B.V., et al. (2002). Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* *21*, 427–436.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus

LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098–7108.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol. Cell* 30, 369–380.

Dickerson, S.J., Xing, Y., Robinson, A.R., Seaman, W.T., Gruffat, H., and Kenney, S.C. (2009). Methylation-Dependent Binding of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein to Viral Promoters. *PLoS Pathog.* 5.

Dillner, J., and Kallin, B. (1988). The Epstein-Barr virus proteins. (Academic Press).

Dillner, J., Kallin, B., Ehlin-Henriksson, B., Rymo, L., Henle, W., Henle, G., and Klein, G. (1986). The Epstein-Barr virus determined nuclear antigen is composed of at least three different antigens. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 37, 195–200.

Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1848–1859.

Dokmanovic, M., and Marks, P.A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 96, 293–304.

Dolcetti, R., and Menezes, J. (2003). Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: new immunobiological and molecular insights on a long-standing etiopathogenic association. *Adv. Cancer Res.* 87, 127–157.

Donadelli, M., Costanzo, C., Beghelli, S., Scupoli, M.T., Dandrea, M., Bonora, A., Piacentini, P., Budillon, A., Caraglia, M., Scarpa, A., et al. (2007). Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1095–1106.

Dosch, H.M., Lam, P., Hui, M.F., Hibi, T., and Cheung, R.K. (1990). EBV utilizes a unique activation pathway for the transformation of human B cells. *Int. Immunol.* 2, 833–848.

Dowdy, S.C., Jiang, S., Zhou, X.C., Hou, X., Jin, F., Podratz, K.C., and Jiang, S.-W. (2006). Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2767–2776.

Draoua, H.Y., Tsao, L., Mancini, D.M., Addonizio, L.J., Bhagat, G., and Alobeid, B. (2004). T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br. J. Haematol.* 127, 429–432.

Dreyfus, D.H., Liu, Y., Ghoda, L.Y., and Chang, J.T. (2011). Analysis of an ankyrin-like region in Epstein Barr Virus encoded (EBV) BZLF-1 (ZEBRA) protein: implications for interactions with NF-κB and p53. *Virol. J.* 8, 422.

- Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., and Benz, C.C. (2005). Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *45*, 495–528.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33–42.
- Dutnall, R.N., and Pillus, L. (2001). Deciphering NAD-dependent deacetylases. *Cell* *105*, 161–164.
- Dutnall, R.N., and Ramakrishnan, V. (1997). Twists and turns of the nucleosome: tails without ends. *Structure* *5*, 1255–1259.
- Duvic, M., Talpur, R., Zhang, C., Goy, A., Richon, V., and Frankel, S.R. (2005). Phase II trial of oral suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) unresponsive to conventional therapy. *ASCO Meet. Abstr.* *23*, 6571.
- Dykstra, M.L., Longnecker, R., and Pierce, S.K. (2001). Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* *14*, 57–67.
- Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* *3*, 224–229.
- Edwards, R.H., Marquitz, A.R., and Raab-Traub, N. (2008). Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs Are Produced from a Large Intron prior to Splicing. *J. Virol.* *82*, 9094–9106.
- El-Guindy, A., Heston, L., Delecluse, H.-J., and Miller, G. (2007). Phosphoacceptor Site S173 in the Regulatory Domain of Epstein-Barr Virus ZEBRA Protein Is Required for Lytic DNA Replication but Not for Activation of Viral Early Genes. *J. Virol.* *81*, 3303–3316.
- Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* *16*, 1731–1742.
- Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* *11*, 435–444.
- Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M., and Young, L.S. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* *14*, 2899–2916.
- Ellis, A., Wang, Z., Yu, X., and Mertz, J.E. (2010). Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 can play a central role in regulating the Epstein-Barr virus latent-lytic switch in a cell-type-specific manner. - PubMed - NCBI.
- Ellis, L., Bots, M., Lindemann, R.K., Bolden, J.E., Newbold, A., Cluse, L.A., Scott, C.L.,

Strasser, A., Atadja, P., Lowe, S.W., et al. (2009). The histone deacetylase inhibitors LAQ824 and LBH589 do not require death receptor signaling or a functional apoptosome to mediate tumor cell death or therapeutic efficacy. *Blood* 114, 380–393.

Ellis-Connell, A., Iempridee, T., Xu, I., and Mertz, J.E. (2010). Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication. - PubMed - NCBI.

Epstein, A. (2012). Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein–Barr virus. *Br. J. Haematol.* 156, 777–779.

Erickson, K.D., and Martin, J.M. (1997). Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology* 234, 1–13.

Erickson, K.D., and Martin, J.M. (2000). The Late Lytic LMP-1 Protein of Epstein-Barr Virus Can Negatively Regulate LMP-1 Signaling. *J. Virol.* 74, 1057–1060.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935.

Evens, A.M., Roy, R., Sterrenberg, D., Moll, M.Z., Chadburn, A., and Gordon, L.I. (2010). Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders: Diagnosis, Prognosis, and Current Approaches to Therapy. *Curr. Oncol. Rep.* 12, 383–394.

Eyüpoglu, I.Y., Hahnen, E., Buslei, R., Siebzehnriibl, F.A., Savaskan, N.E., Lüders, M., Tränkle, C., Wick, W., Weller, M., Fahlbusch, R., et al. (2005). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo. *J. Neurochem.* 93, 992–999.

Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J. Virol.* 74, 5810–5818.

Fandy, T.E., and Srivastava, R.K. (2006). Trichostatin A sensitizes TRAIL-resistant myeloma cells by downregulation of the antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58, 471–477.

Fandy, T.E., Shankar, S., Ross, D.D., Sausville, E., and Srivastava, R.K. (2005). Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma. *Neoplasia N. Y. N* 7, 646–657.

Faulkner, G.C., Burrows, S.R., Khanna, R., Moss, D.J., Bird, A.G., and Crawford, D.H. (1999). X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J. Virol.* 73, 1555–1564.

- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Feng, L., Lin, T., Uranishi, H., Gu, W., and Xu, Y. (2005). Functional Analysis of the Roles of Posttranslational Modifications at the p53 C Terminus in Regulating p53 Stability and Activity. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5389–5395.
- Feng, L., Pan, M., Sun, J., Lu, H., Shen, Q., Zhang, S., Jiang, T., Liu, L., Jin, W., Chen, Y., et al. (2013). Histone deacetylase 3 inhibits expression of PUMA in gastric cancer cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 49–58.
- Feng, W., Kraus, R.J., Dickerson, S.J., Lim, H.J., Jones, R.J., Yu, X., Mertz, J.E., and Kenney, S.C. (2007). ZEB1 and c-Jun Levels Contribute to the Establishment of Highly Lytic Epstein-Barr Virus Infection in Gastric AGS Cells. *J. Virol.* 81, 10113–10122.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., and Fearon, D.T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4510–4514.
- Fingerroth, J.D., Clabby, M.L., and Strominger, J.D. (1988). Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J. Virol.* 62, 1442–1447.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188–193.
- Fischer, frade, and faumont (1991). Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425, 475–479.
- Flamand, L., and Menezes, J. (1996). Cyclic AMP-responsive element-dependent activation of Epstein-Barr virus zebra promoter by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 70, 1784–1791.
- Flavell, K.J., and Murray, P.G. (2000). Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol. Pathol.* 53, 262–269.
- Flemington, E., and Speck, S.H. (1990a). Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.* 64, 1217–1226.
- Flemington, E., and Speck, S.H. (1990b). Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.* 64, 1227–1232.
- Flór, T.B., and Blom, B. (2016). Pathogens Use and Abuse MicroRNAs to Deceive the Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 538.
- Forte, E., and Luftig, M.A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 13, 1156–1167.

- Frade, R., Barel, M., and Ehlin-Henriksson, B. (1985). gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor.
- French, L.E., and Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ.* 10, 117–123.
- Frew, A.J., Johnstone, R.W., and Bolden, J.E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett.* 280, 125–133.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2001). Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 87–92.
- Gahn, T.A., and Sugden, B. (1995). An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J. Virol.* 69, 2633–2636.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., and Steinkühler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* 17, 195–211.
- Gao, X., Tajima, M., and Sairenji, T. (1999). Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258, 375–381.
- Gao, X., Ikuta, K., Tajima, M., and Sairenji, T. (2001). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology* 286, 91–99.
- Garibal, J., Hollville, É., Bell, A.I., Kelly, G.L., Renouf, B., Kawaguchi, Y., Rickinson, A.B., and Wiels, J. (2007). Truncated Form of the Epstein-Barr Virus Protein EBNA-LP Protects against Caspase-Dependent Apoptosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *J. Virol.* 81, 7598–7607.
- Gartel, A.L. (2005). The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leuk. Res.* 29, 1237–1238.
- George, N.M., Evans, J.J.D., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* 21, 1937–1948.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., and Goldstein, L.I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet Lond. Engl.* 2, 988–989.
- Ghosh, S.K., Perrine, S.P., Williams, R.M., and Faller, D.V. (2012). Histone deacetylase inhibitors are potent inducers of gene expression in latent EBV and sensitize lymphoma cells to nucleoside antiviral agents. *Blood* 119, 1008–1017.
- Gillenwater, A.M., Zhong, M., and Lotan, R. (2007). Histone deacetylase inhibitor

suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2967–2975.

Giot, J.F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J.C., and Sergeant, A. (1991). Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res.* 19, 1251–1258.

Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* 16, 6131–6140.

Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* 18, 3064–3073.

Giulino, L., Mathew, S., Ballon, G., Chadburn, A., Barouk, S., Antonicelli, G., Leoncini, L., Liu, Y.F., Gogineni, S., Tam, W., et al. (2011). A20 (TNFAIP3) genetic alterations in EBV-associated AIDS-related lymphoma. *Blood* 117, 4852–4854.

Glaser, K.B. (2007). HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem. Pharmacol.* 74, 659–671.

Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F., Stender, J., Ulrich, R.G., and Davidsen, S.K. (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2, 151–163.

Glozak, M.A., and Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26, 5420–5432.

Goswami, R., Gershburg, S., Satorius, A., and Gershburg, E. (2012). Protein kinase inhibitors that inhibit induction of lytic program and replication of Epstein-Barr virus. *Antiviral Res.* 96, 296–304.

Grabiec, A.M., Krausz, S., de Jager, W., Burakowski, T., Groot, D., Sanders, M.E., Prakken, B.J., Maslinski, W., Eldering, E., Tak, P.P., et al. (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2718–2728.

Gratama, J.W., and Ernberg, I. (1995). Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 67, 197–255.

Gratama, J.W., Oosterveer, M.A., Zwaan, F.E., Lepoutre, J., Klein, G., and Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8693–8696.

- Gray, S.G., and Ekström, T.J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* 262, 75–83.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 353–363.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.-M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 338, 17–31.
- Greifenegger, N., Jäger, M., Kunz-Schughart, L.A., Wolf, H., and Schwarzmann, F. (1998). Epstein-Barr Virus Small RNA (EBER) Genes: Differential Regulation during Lytic Viral Replication. *J. Virol.* 72, 9323–9328.
- Greijer, A.E., Dekkers, C.A.J., and Middeldorp, J.M. (2000). Human Cytomegalovirus Virions Differentially Incorporate Viral and Host Cell RNA during the Assembly Process. *J. Virol.* 74, 9078–9082.
- Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D., and Auriault, C. (1997). Isolation and Characterization of Transformed Human T-Cell Lines Infected by Epstein-Barr Virus. *Blood* 89, 4521–4530.
- Grozinger, C.M., Chao, E.D., Blackwell, H.E., Moazed, D., and Schreiber, S.L. (2001). Identification of a Class of Small Molecule Inhibitors of the Sirtuin Family of NAD-dependent Deacetylases by Phenotypic Screening. *J. Biol. Chem.* 276, 38837–38843.
- Gruffat, H., and Sergeant, A. (1994). Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res.* 22, 1172–1178.
- Gruffat, H., Portes-Sentis, S., Sergeant, A., and Manet, E. (1999). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) encodes a homologue of the Epstein-Barr virus bZip protein EB1. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 3), 557–561.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhiel, B., Manet, E., Hammerschmidt, W., and Sergeant, A. (2002). Epstein-Barr Virus mRNA Export Factor EB2 Is Essential for Production of Infectious Virus. *J. Virol.* 76, 9635–9644.
- Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C. (2003). Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302, 1396–1398.
- Grywalska, E., and Rolinski, J. (2015). Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomas. *Semin. Oncol.* 42, 291–303.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595–606.
- Guan, M., Zhang, R.D., Wu, B., and Henderson, E.E. (1996). Infection of primary CD4+ and CD8+ T lymphocytes by Epstein-Barr virus enhances human immunodeficiency virus expression. *J. Virol.* 70, 7341–7346.

- Gui, C.-Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M., and Marks, P.A. (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1241–1246.
- Guo, F., Sigua, C., Tao, J., Bali, P., George, P., Li, Y., Wittmann, S., Moscinski, L., Atadja, P., and Bhalla, K. (2004). Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res.* *64*, 2580–2589.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* *277*, 13430–13437.
- Gutsch, D.E., Holley-Guthrie, E.A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M.A., Baldwin, A.S., and Kenney, S.C. (1994). The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 1939–1948.
- Haan, K.M., Kwok, W.W., Longnecker, R., and Speck, P. (2000). Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J. Virol.* *74*, 2451–2454.
- Hagemeier, S.R., Dickerson, S.J., Meng, Q., Yu, X., Mertz, J.E., and Kenney, S.C. (2010). Sumoylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein inhibits its transcriptional activity and is regulated by the virus-encoded protein kinase. *J. Virol.* *84*, 4383–4394.
- Hagemeier, S.R., Barlow, E.A., Kleman, A.A., and Kenney, S.C. (2011). The Epstein-Barr virus BRRF1 protein, Na, induces lytic infection in a TRAF2- and p53-dependent manner. *J. Virol.* *85*, 4318–4329.
- Hagemeier, S.R., Barlow, E.A., Meng, Q., and Kenney, S.C. (2012). The cellular ataxia telangiectasia-mutated kinase promotes epstein-barr virus lytic reactivation in response to multiple different types of lytic reactivation-inducing stimuli. *J. Virol.* *86*, 13360–13370.
- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4389–4394.
- H Gruffat, E.M. (2002). MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep* *3*:141-146. *EMBO Rep.* *3*, 141–146.
- Hammerschmidt, W. (2015). The Epigenetic Life Cycle of Epstein-Barr Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *390*, 103–117.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* *55*, 427–433.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of

Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393–397.

Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (2013). Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013029.

Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., and Ulevitch, R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296–299.

Harada, S., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* 71, 6611–6618.

He, L.Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrell, R.P., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M., and Pandolfi, P.P. (2001). Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 108, 1321–1330.

Hecht, J.L., and Aster, J.C. (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 3707–3721.

Heilmann, A.M.F., Calderwood, M.A., Portal, D., Lu, Y., and Johannsen, E. (2012). Genome-Wide Analysis of Epstein-Barr Virus Rta DNA Binding. *J. Virol.* 86, 5151–5164.

Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., and Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92–95.

Hennessy, K., Fennewald, S., and Kieff, E. (1985). A third viral nuclear protein in lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5944–5948.

Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W., and Kieff, E. (1986). Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5693–5697.

Henson, B.W., Perkins, E.M., Cothran, J.E., and Desai, P. (2009). Self-Assembly of Epstein-Barr Virus Capsids. *J. Virol.* 83, 3877–3890.

Heslop, H.E. (2009). How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* 114, 4002–4008.

Higuchi, M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: Protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4675–4680.

Hildmann, C., Riester, D., and Schwienhorst, A. (2007). Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 487–497.

Hjalgrim, H. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease - Human Herpesviruses - NCBI Bookshelf.

- Hjalgrim, H., Friberg, J., and Melbye, M. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavölgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K.I. (1999). Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93, 3956–3963.
- Hömig-Hölzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Müller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., et al. (2008). Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 205, 1317–1329.
- Hong, G.K., Delecluse, H.-J., Gruffat, H., Morrison, T.E., Feng, W.-H., Sergeant, A., and Kenney, S.C. (2004). The BRRF1 early gene of Epstein-Barr virus encodes a transcription factor that enhances induction of lytic infection by BRLF1. *J. Virol.* 78, 4983–4992.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In *Apoptosis and Medicine*, T. Ntuli, ed. (InTech), p.
- Hsieh, J.J., and Hayward, S.D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560–563.
- Hsieh, Y.-H., Su, I.-J., Yen, C.-J., Tsai, T.-F., Tsai, H.-W., Tsai, H.-N., Huang, Y.-J., Chen, Y.-Y., Ai, Y.-L., Kao, L.-Y., et al. (2013). Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid suppresses the pro-oncogenic effects induced by hepatitis B virus pre-S2 mutant oncoprotein and represents a potential chemopreventive agent in high-risk chronic HBV patients. *Carcinogenesis* 34, 475–485.
- Hsu, J.L., and Glaser, S.L. (2000). Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34, 27–53.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J.W. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12401–12406.
- Hsu, Y.-F., Sheu, J.-R., Hsiao, G., Lin, C.-H., Chang, T.-H., Chiu, P.-T., Wang, C.-Y., and Hsu, M.-J. (2011). p53 in trichostatin A induced C6 glioma cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 504–513.
- Huang, H., Pan, X.H., Zhou, J.H., Yu, L., Kong, X.T., Zhou, S.M., Li, Z.J., Fu, Q., and Sun, X.Y. (1998). The effect of Epstein-Barr virus gene BHRF1 expression on radioresistance of nasopharyngeal carcinoma cells. *ORL J. Oto-Rhino-Laryngol. Its Relat. Spec.* 60, 329–333.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Hudnall, S.D., Ge, Y., Wei, L., Yang, N.-P., Wang, H.-Q., and Chen, T. (2005). Distribution

and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 18, 519–527.

Hudson, G.S., Bankier, A.T., Satchwell, S.C., and Barrell, B.G. (1985). The short unique region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology* 147, 81–98.

Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549–560.

Humphrey, G.W., Wang, Y., Russanova, V.R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y., and Howard, B.H. (2001). Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J. Biol. Chem.* 276, 6817–6824.

Hurley, E.A., and Thorley-Lawson, D.A. (1988). B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J. Exp. Med.* 168, 2059–2075.

Hutchings, I.A., Tierney, R.J., Kelly, G.L., Stylianou, J., Rickinson, A.B., and Bell, A.I. (2006). Methylation status of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI W latent cycle promoter and promoter activity: analysis with novel EBV-positive Burkitt and lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 80, 10700–10711.

Iacomino, G., Medici, M.C., and Russo, G.L. (2008). Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 855–864.

IARC Monographs (1997). IARC Monographs- Monographs available in PDF format.

Iempridee, T., Das, S., Xu, I., and Mertz, J.E. (2011). Transforming growth factor beta-induced reactivation of Epstein-Barr virus involves multiple Smad-binding elements cooperatively activating expression of the latent-lytic switch BZLF1 gene. *J. Virol.* 85, 7836–7848.

Inoue, S., MacFarlane, M., Harper, N., Wheat, L.M.C., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2004). Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death Differ.* 11 Suppl 2, S193–206.

Inoue, S., Riley, J., Gant, T.W., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2007). Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* 21, 1773–1782.

Inoue, S., Harper, N., Walewska, R., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2009). Enhanced Fas-associated death domain recruitment by histone deacetylase inhibitors is critical for the sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 8, 3088–3097.

Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., and

- Oshimi, K. (2004). Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res.* *64*, 2167–2174.
- Isobe, Y., Sugimoto, K., Matsuura, I., Takada, K., and Oshimi, K. (2008). Epstein-Barr virus renders the infected natural killer cell line, NKL resistant to doxorubicin-induced apoptosis. *Br. J. Cancer* *99*, 1816–1822.
- Iwasaki, W., Miya, Y., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tachiwana, H., Shibata, T., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2013). Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio* *3*, 363–369.
- Izumi, K.M., and Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12592–12597.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M., and Kieff, E.D. (1994). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *68*, 4369–4376.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B., and Kieff, E.D. (1999). The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5759–5767.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.
- Jiang, X., and Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 87–106.
- Jiang, R., Gu, X., Moore-Medlin, T.N., Nathan, C.-A., and Hutt-Fletcher, L.M. (2012). Oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation between increased expression of CD21, Epstein-Barr virus and CK19. *Oral Oncol.* *48*, 836–841.
- Jiang, W.Q., Szekely, L., Wendel-Hansen, V., Ringertz, N., Klein, G., and Rosén, A. (1991). Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp. Cell Res.* *197*, 314–318.
- Jiménez-Ramírez, C., Brooks, A.J., Forshell, L.P., Yakimchuk, K., Zhao, B., Fulgham, T.Z., and Sample, C.E. (2006). Epstein-Barr virus EBNA-3C is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *J. Virol.* *80*, 11200–11208.
- Jochum, S., Ruiss, R., Moosmann, A., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012a). RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E1396–1404.

- Jochum, S., Moosmann, A., Lang, S., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012b). The EBV Immune-evasins vIL-10 and BNLf2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination. *PLOS Pathog* 8, e1002704.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., and Grossman, S.R. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J. Virol.* 69, 253–262.
- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M.R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., and Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16286–16291.
- Johansen, L.M., Deppmann, C.D., Erickson, K.D., Coffin III, W.F., Thornton, T.M., Humphrey, S.E., Martin, J.M., and Taparowsky, E.J. (2003). EBNA2 and Activated Notch Induce Expression of BATF. *J. Virol.* 77, 6029–6040.
- Johansson, P., Jansson, A., Rüetschi, U., and Rymo, L. (2009). Nuclear factor-kappaB binds to the Epstein-Barr Virus LMP1 promoter and upregulates its expression. *J. Virol.* 83, 1393–1401.
- Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 287–299.
- Johnstone, R.W., and Licht, J.D. (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 4, 13–18.
- Johnstone, R.W., Frew, A.J., and Smyth, M.J. (2008). Access : The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy : *Nature Reviews Cancer*.
- Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Henderson, B.E., Munube, G.M.R., Tukei, P.M., Day, N.E., Henle, G., Henle, W., Morrow, R.H., Pike, M.C., et al. (1972). EPSTEIN-BARR VIRUS ANTIBODY LEVELS IN CHILDREN FROM THE WEST NILE DISTRICT OF UGANDA. *The Lancet* 299, 706–709.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* 73, 4481–4484.
- Kalamvoki, M., Du, T., and Roizman, B. (2014). Cells infected with herpes simplex virus 1 export to uninfected cells exosomes containing STING, viral mRNAs, and microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4991–4996.
- Kaler, P., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Augenlicht, L., and Klampfer, L. (2008). HDAC2 deficiency sensitizes colon cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity. *Exp. Cell Res.* 314, 1507–1518.
- Kalla, M., Schmeinck, A., Bergbauer, M., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (2010). AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the

- epigenetic state of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 850–855.
- Kalla, M., Göbel, C., and Hammerschmidt, W. (2012). The Lytic Phase of Epstein-Barr Virus Requires a Viral Genome with 5-Methylcytosine Residues in CpG Sites. *J. Virol.* *86*, 447–458.
- Kang, M.-S., and Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* *47*, e131.
- Kang, Y.-H., Yi, M.-J., Kim, M.-J., Park, M.-T., Bae, S., Kang, C.-M., Cho, C.-K., Park, I.-C., Park, M.-J., Rhee, C.H., et al. (2004). Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res.* *64*, 8960–8967.
- Karagiannis, T.C., and Ververis, K. (2012). Potential of chromatin modifying compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* *2*.
- Karimi, L., Crawford, D.H., Speck, S., and Nicholson, L.J. (1995). Identification of an epithelial cell differentiation responsive region within the BZLF1 promoter of the Epstein—Barr virus. *J. Gen. Virol.* *76*, 759–765.
- Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* *16*, 7054–7066.
- Kawano, T., Akiyama, M., Agawa-Ohta, M., Mikami-Terao, Y., Iwase, S., Yanagisawa, T., Ida, H., Agata, N., and Yamada, H. (2010). Histone deacetylase inhibitors valproic acid and depsipeptide sensitize retinoblastoma cells to radiotherapy by increasing H2AX phosphorylation and p53 acetylation-phosphorylation. *Int. J. Oncol.* *37*, 787–795.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9150–9154.
- Kelly, P.N., and Strasser, A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* *18*, 1414–1424.
- Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002a). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* *8*, 1098–1104.
- Kelly, W.K., O'Connor, O.A., and Marks, P.A. (2002b). Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* *11*, 1695–1713.
- Kelly, W.K., Richon, V.M., O'Connor, O., Curley, T., MacGregor-Curtelli, B., Tong, W., Klang, M., Schwartz, L., Richardson, S., Rosa, E., et al. (2003). Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 3578–3588.

- Kelly, W.K., O'Connor, O.A., Krug, L.M., Chiao, J.H., Heaney, M., Curley, T., MacGregore-Cortelli, B., Tong, W., Secrist, J.P., Schwartz, L., et al. (2005). Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 3923–3931.
- Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2014a). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* 26, 60–68.
- Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2014b). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* 26, 60–68.
- Kieff, E. (1990). *Epstein-Barr Virus and Its Replication*.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* 17, 1700–1709.
- Kim, H.-J., and Bae, S.-C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* 3, 166–179.
- Kim, H.-E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17545–17550.
- Kim, Y.K., Seo, D.-W., Kang, D.-W., Lee, H.Y., Han, J.-W., and Kim, S.-N. (2006). Involvement of HDAC1 and the PI3K/PKC signaling pathways in NF- κ B activation by the HDAC inhibitor apicidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 1088–1093.
- Kis, L.L., Takahara, M., Nagy, N., Klein, G., and Klein, E. (2006). IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma-derived cell lines. *Blood* 107, 2928–2935.
- Kis, L.L., Salamon, D., Persson, E.K., Nagy, N., Scheeren, F.A., Spits, H., Klein, G., and Klein, E. (2010). IL-21 imposes a type II EBV gene expression on type III and type I B cells by the repression of C- and activation of LMP-1-promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 872–877.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., et al. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91, 3379–3389.
- Knutson, J.C. (1990). The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus

gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.* 64, 2530–2536.

Komano, J., Sugiura, M., and Takada, K. (1998). Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 72, 9150–9156.

Konforte, D., and Paige, C.J. (2009). Interleukin-21 regulates expression of the immediate-early lytic cycle genes and proteins in Epstein-Barr Virus infected B cells. *Virus Res.* 144, 339–343.

Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 40–48.

Krämer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jäger, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E., and Heinzl, T. (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 20, 473–485.

Kraus, R.J., Mirocha, S.J., Stephany, H.M., Puchalski, J.R., and Mertz, J.E. (2001). Identification of a Novel Element Involved in Regulation of the Lytic Switch BZLF1 Gene Promoter of Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 75, 867–877.

Kraus, R.J., Perrigoue, J.G., and Mertz, J.E. (2003). ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 77, 199–207.

Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E., and Allis, C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12, 627–639.

Küppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 801–812.

Kutok, J.L., and Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 375–404.

Kuzembayeva, M., Hayes, M., and Sugden, B. (2014). Multiple functions are mediated by the miRNAs of Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Virol.* 7, 61–65.

Labbé, K., and Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15, 1339–1349.

Lagger, G., Doetzlhofer, A., Schuettengruber, B., Haidweger, E., Simboeck, E., Tischler, J., Chiocca, S., Suske, G., Rotheneder, H., Wintersberger, E., et al. (2003). The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2669–2679.

Lagneaux, L., Gillet, N., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Meuleman, N., Kentos, A., Martiat, P., Willems, L., et al. (2007). Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp. Hematol.* 35, 1527–1537.

- Laichalk, L.L., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 79, 1296–1307.
- Lakin, N.D., and Jackson, S.P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644–7655.
- Lang, D.J., Garruto, R.M., and Gajdusek, D.C. (1977). Early acquisition of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus antibody in several isolated Melanesian populations. *Am. J. Epidemiol.* 105, 480–487.
- Lau, R., Middeldorp, J., and Farrell, P.J. (1993). Epstein-Barr virus gene expression in oral hairy leukoplakia. *Virology* 195, 463–474.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., and Bornkamm, G.W. (1994). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J. Virol.* 68, 6947–6958.
- Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* 118, 265–267.
- Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 284–295.
- Lee, N., Yario, T.A., Gao, J.S., and Steitz, J.A. (2016). EBV noncoding RNA EBER2 interacts with host RNA-binding proteins to regulate viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3221–3226.
- Lehrmann, H., Pritchard, L.L., and Harel-Bellan, A. (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv. Cancer Res.* 86, 41–65.
- Leight, E.R., and Sugden, B. (2000). EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 10, 83–100.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685–688.
- Li, H., and Wu, X. (2004). Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 860–867.
- Li, J., Meyer, A.N., and Donoghue, D.J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 502–507.
- Li, L., Su, X., Choi, G.C.G., Cao, Y., Ambinder, R.F., and Tao, Q. (2012a). Methylation

profiling of Epstein-Barr virus immediate-early gene promoters, BZLF1 and BRLF1 in tumors of epithelial, NK- and B-cell origins. *BMC Cancer* 12, 125.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99.

Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* 277, 50607–50611.

Li, Y., Zhang, Y., Fu, M., Yao, Q., Zhuo, H., Lu, Q., Niu, X., Zhang, P., Pei, Y., and Zhang, K. (2012b). Parthenolide induces apoptosis and lytic cytotoxicity in Epstein-Barr virus-positive Burkitt lymphoma. *Mol. Med. Rep.* 6, 477–482.

Liang, C.-L., Chen, J.-L., Hsu, Y.-P.P., Ou, J.T., and Chang, Y.-S. (2002). Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 23345–23357.

Lin, Z., and Flemington, E.K. (2011). miRNAs in the pathogenesis of oncogenic human viruses. *Cancer Lett.* 305, 186–199.

Lin, Z., Wang, X., Fewell, C., Cameron, J., Yin, Q., and Flemington, E.K. (2010). Differential Expression of the miR-200 Family MicroRNAs in Epithelial and B Cells and Regulation of Epstein-Barr Virus Reactivation by the miR-200 Family Member miR-429. *J. Virol.* 84, 7892–7897.

Lindemann, R.K., Newbold, A., Whitecross, K.F., Cluse, L.A., Frew, A.J., Ellis, L., Williams, S., Wiegman, A.P., Dear, A.E., Scott, C.L., et al. (2007). Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8071–8076.

Ling, P.D., Ryon, J.J., and Hayward, S.D. (1993). EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J. Virol.* 67, 2990–3003.

Liu, P., Liu, S., and Speck, S.H. (1998). Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J. Virol.* 72, 8230–8239.

Liu, S., Liu, P., Borrás, A., Chatila, T., and Speck, S.H. (1997a). Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *EMBO J.* 16, 143–153.

Liu, S., Borrás, A.M., Liu, P., Suske, G., and Speck, S.H. (1997b). Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *Virology* 228, 11–18.

Liu, S.-F., Wang, H., Lin, X.-C., Xiang, H., Deng, X.-Y., Li, W., Tang, M., and Cao, Y. (2008). NF-kappaB inhibitors induce lytic cytotoxicity in Epstein-Barr virus-positive

nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Biol. Int.* 32, 1006–1013.

Lo, A.K.F., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W.M., Hui, J.W.Y., Liao, G., and Hayward, S.D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16164–16169.

Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv. Cancer Res.* 79, 175–200.

Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

Lugrin, J., Ciarlo, E., Santos, A., Grandmaison, G., Dos Santos, I., Le Roy, D., and Roger, T. (2013). The sirtuin inhibitor cambinol impairs MAPK signaling, inhibits inflammatory and innate immune responses and protects from septic shock. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 1498–1510.

Luka, J., Miller, G., Jörnvall, H., and Pearson, G.R. (1986). Characterization of the restricted component of Epstein-Barr virus early antigens as a cytoplasmic filamentous protein. *J. Virol.* 58, 748–756.

Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., and Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408, 377–381.

Ma, S.-D., Yu, X., Mertz, J.E., Gumperz, J.E., Reinheim, E., Zhou, Y., Tang, W., Burlingham, W.J., Gulley, M.L., and Kenney, S.C. (2012). An Epstein-Barr Virus (EBV) Mutant with Enhanced BZLF1 Expression Causes Lymphomas with Abortive Lytic EBV Infection in a Humanized Mouse Model. *J. Virol.* 86, 7976–7987.

MacCallum, P., Karimi, L., and Nicholson, L.J. (1999). Definition of the transcription factors which bind the differentiation responsive element of the Epstein-Barr virus BZLF1 Z promoter in human epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 80, 1501–1512.

Mackett, M., Conway, M.J., Arrand, J.R., Haddad, R.S., and Hutt-Fletcher, L.M. (1990). Characterization and expression of a glycoprotein encoded by the Epstein-Barr virus BamHI I fragment. *J. Virol.* 64, 2545–2552.

Mackey, D., and Sugden, B. (1999). The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3349–3359.

Macswen, K.F., and Crawford, D.H. (2003). Epstein-Barr virus—recent advances. *Lancet Infect. Dis.* 3, 131–140.

Maggio, S.C., Rosato, R.R., Kramer, L.B., Dai, Y., Rahmani, M., Paik, D.S., Czarnik, A.C., Payne, S.G., Spiegel, S., and Grant, S. (2004). The histone deacetylase inhibitor MS-275

interacts synergistically with fludarabine to induce apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res.* 64, 2590–2600.

Mahmood, Z., and Shukla, Y. (2010). Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp. Cell Res.* 316, 887–899.

Mahot, S., Fender, P., Vivès, R.R., Caron, C., Perrissin, M., Gruffat, H., Sergeant, A., and Drouet, E. (2005). Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res.* 110, 187–193.

Mainou, B.A., Everly, D.N., and Raab-Traub, N. (2007). Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J. Virol.* 81, 9680–9692.

Mancao, C., and Hammerschmidt, W. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110, 3715–3721.

Manet, E., Gruffat, H., Trescol-Biemont, M.C., Moreno, N., Chambard, P., Giot, J.F., and Sergeant, A. (1989). Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO J.* 8, 1819–1826.

Manet, E., Rigolet, A., Gruffat, H., Giot, J.F., and Sergeant, A. (1991). Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res.* 19, 2661–2667.

Manet, E., Allera, C., Gruffat, H., Mikaelian, I., Rigolet, A., and Sergeant, A. (1993). The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr.* 3, 49–59.

Manet, E., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2003). Cycle productif du virus d'Epstein-Barr : rôle de la protéine virale EB1 dans l'activation du cycle productif et interactions protéine EB1-cellules hôte. *Virologie* 7, 111–123.

Mannick, J.B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E., and Stamler, J.S. (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79, 1137–1146.

Marchini, A., Scott, E.M., and Rommelaere, J. (2016). Overcoming Barriers in Oncolytic Virotherapy with HDAC Inhibitors and Immune Checkpoint Blockade. *Viruses* 8.

Marks, P.A. (2006). Thioredoxin in cancer--role of histone deacetylase inhibitors. *Semin. Cancer Biol.* 16, 436–443.

Marks, P.A., and Xu, W.-S. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J. Cell. Biochem.* 107, 600–608.

Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W.K. (2001a). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1, 194–202.

- Marks, P.A., Richon, V.M., and Rifkind, R.A. (2000). Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1210–1216.
- Marks, P.A., Richon, V.M., Breslow, R., and Rifkind, R.A. (2001b). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr. Opin. Oncol.* *13*, 477–483.
- Marks, P.A., Richon, V.M., Miller, T., and Kelly, W.K. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* *91*, 137–168.
- Marquitz, A.R., Mathur, A., Edwards, R.H., and Raab-Traub, N. (2015). Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI A Rightward Transcript Region. *J. Virol.* *89*, 11256–11268.
- Marshall, W.L., Yim, C., Gustafson, E., Graf, T., Sage, D.R., Hanify, K., Williams, L., Fingerroth, J., and Finberg, R.W. (1999). Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J. Virol.* *73*, 5181–5185.
- Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* *22*, 355–370.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* *21*, 6820–6831.
- Matthews, G.M., Newbold, A., and Johnstone, R.W. (2012). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity. *Adv. Cancer Res.* *116*, 165–197.
- Mc Guire, C., Beyaert, R., and van Loo, G. (2011). Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* *34*, 619–628.
- McDonald, C., Karstegl, C.E., Kellam, P., and Farrell, P.J. (2010). Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J. Gen. Virol.* *91*, 622–629.
- McKinsey, T.A., and Olson, E.N. (2005). Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J. Clin. Invest.* *115*, 538–546.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 497–504.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2002a). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 40–47.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2002b). Signaling chromatin to make muscle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 763–772.

- Mellor, J. (2006). Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet.* 22, 320–329.
- Menendez, D., Alberto, I., and Resnick, M. (2009). The expanding universe of p53 targets : Article : *Nature Reviews Cancer*.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A.T.P., van den Brule, A.J.C., and Meijer, C.J.L.M. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45, 1–36.
- Miller, W.E., Edwards, R.H., Walling, D.M., and Raab-Traub, N. (1994). Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol.* 75 (*Pt 10*), 2729–2740.
- Minowada, J., Ohnuma, T., and Moore, G.E. (1972). Rosette-Forming Human Lymphoid Cell Lines. I. Establishment and Evidence for Origin of Thymus-Derived Lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 891–895.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., McMullan, C., Poulaki, V., Fanourakis, G., Schlossman, R., Chauhan, D., Munshi, N.C., Hideshima, T., et al. (2003). Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* 101, 4055–4062.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J. Virol.* 71, 4882–4891.
- Moghaddam, A., Rosenzweig, M., Lee-Parritz, D., Annis, B., Johnson, R.P., and Wang, F. (1997). An Animal Model for Acute and Persistent Epstein-Barr Virus Infection. *Science* 276, 2030–2033.
- Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2000). Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.* 74, 6324–6332.
- Molkentin, J.D., and Olson, E.N. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9366–9373.
- Montalvo, E.A., Cottam, M., Hill, S., and Wang, Y.J. (1995). YY1 binds to and regulates cis-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J. Virol.* 69, 4158–4165.
- Moore, P.S., Gao, S.J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D.M., Garber, R., Pellett, P.E., McGeoch, D.J., and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J. Virol.* 70, 549–558.
- Moriuchi, M., and Moriuchi, H. (2003). Increased susceptibility to HIV-1 of peripheral blood lymphocytes in acute infection with Epstein-Barr virus. *J. Med. Virol.* 71, 343–346.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389–399.

- Moss, W.N., Lee, N., Pimienta, G., and Steitz, J.A. (2014). RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biol.* 11, 10–17.
- Mullen, M.M., Haan, K.M., Longnecker, R., and Jardetzky, T.S. (2002). Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol. Cell* 9, 375–385.
- Murata, T. (2014). Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol. Immunol.* 58, 307–317.
- Murata, T., Sato, Y., Nakayama, S., Kudoh, A., Iwahori, S., Isomura, H., Tajima, M., Hishiki, T., Ohshima, T., Hijikata, M., et al. (2009). TORC2, a Coactivator of cAMP-response Element-binding Protein, Promotes Epstein-Barr Virus Reactivation from Latency through Interaction with Viral BZLF1 Protein. *J. Biol. Chem.* 284, 8033–8041.
- Murata, T., Hotta, N., Toyama, S., Nakayama, S., Chiba, S., Isomura, H., Ohshima, T., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* 285, 23925–23935.
- Murata, T., Noda, C., Saito, S., Kawashima, D., Sugimoto, A., Isomura, H., Kanda, T., Yokoyama, K.K., and Tsurumi, T. (2011). Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency. *J. Biol. Chem.* 286, 22007–22016.
- Murata, T., Iwata, S., Siddiquey, M.N.A., Kanazawa, T., Goshima, F., Kawashima, D., Kimura, H., and Tsurumi, T. (2013a). Heat Shock Protein 90 Inhibitors Repress Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Expression and Proliferation of Epstein-Barr Virus-Positive Natural Killer Cell Lymphoma.
- Murata, T., Narita, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2013b). Contribution of myocyte enhancer factor 2 family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency. *J. Virol.* 87, 10148–10162.
- Murata, T., Sato, Y., and Kimura, H. (2014). Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 24, 242–253.
- Murray, P.G., and Young, L.S. (2001). Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* null, 1–20.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355–365.
- Nakata, S., Yoshida, T., Horinaka, M., Shiraishi, T., Wakada, M., and Sakai, T. (2004). Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* 23, 6261–6271.
- Nanbo, A., Terada, H., Kachi, K., Takada, K., and Matsuda, T. (2012). Roles of cell signaling pathways in cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission. *J. Virol.* 86, 9285–9296.

- Naresh, K.N., Johnson, J., Srinivas, V., Soman, C.S., Saikia, T., Advani, S.H., Badwe, R.A., Dinshaw, K.A., Muckaden, M., Magrath, I., et al. (2000). Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed-Sternberg cells. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 11, 91–96.
- Narlikar, G.J., Fan, H.-Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475–487.
- Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., et al. (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat. Med.* 11, 77–84.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., and Youle, R.J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1265–1276.
- Newbold, A., Vervoort, S.J., Martin, B.P., Bots, M., and Johnstone, R.W. (2012). Induction of autophagy does not alter the anti-tumor effects of HDAC inhibitors. *Cell Death Dis.* 3, e387.
- Nicholson, D.W. (1999). Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic death. *Cell Death Differ.* 6, 1028–1042. *Cell Death Differ.* 6, 1028–1042.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H., and Young, L.S. (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J. Pathol.* 182, 151–159.
- Nikitin, P.A., Yan, C.M., Forte, E., Bocedi, A., Tourigny, J.P., White, R.E., Allday, M.J., Patel, A., Dave, S.S., Kim, W., et al. (2010). An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell Host Microbe* 8, 510–522.
- Niller, H.H., Salamon, D., Uhlig, J., Ranf, S., Granz, M., Schwarzmann, F., Wolf, H., and Minarovits, J. (2002). Nucleoprotein Structure of Immediate-Early Promoters Zp and Rp and of oriLyt of Latent Epstein-Barr Virus Genomes.
- Ning, S. (2011). Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae* 2, 1.
- Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A. (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J. Virol.* 71, 6619–6628.
- Nonkwelo, C., Ruf, I.K., and Sample, J. (1997). The Epstein-Barr virus EBNA-1 promoter Qp requires an initiator-like element. *J. Virol.* 71, 354–361.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* 11, 437–444.

- Nusinzon, I., and Horvath, C.M. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 14742–14747.
- Nusinzon, I., and Horvath, C.M. (2005). Histone deacetylases as transcriptional activators? Role reversal in inducible gene regulation. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2005*, re11.
- Ocker, M., and Schneider-Stock, R. (2007). Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 1367–1374.
- Oda, T., Imai, S., Chiba, S., and Takada, K. (2000). Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology* *276*, 52–58.
- Odumade, O.A., Hogquist, K.A., and Balfour, H.H. (2011). Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* *24*, 193–209.
- Oussaief, L., Ramírez, V., Hippocrate, A., Arbach, H., Cochet, C., Proust, A., Raphaël, M., Khelifa, R., and Joab, I. (2011). NF-κB-Mediated Modulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Activity Controls Induction of the Epstein-Barr Virus Productive Cycle by Transforming Growth Factor Beta 1. *J. Virol.* *85*, 6502–6512.
- Ozören, N., and El-Deiry, W.S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia N. Y.* *N 4*, 551–557.
- Packham, G., Economou, A., Rooney, C.M., Rowe, D.T., and Farrell, P.J. (1990). Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J. Virol.* *64*, 2110–2116.
- Paine, E., Scheinman, R.I., Baldwin, A.S., and Raab-Traub, N. (1995). Expression of LMP1 in epithelial cells leads to the activation of a select subset of NF-kappa B/Rel family proteins. *J. Virol.* *69*, 4572–4576.
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S.J., Rowe, M., Lisse, I., Ralfkiaer, E., Sandvej, K., and Young, L.S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus replicative proteins in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma cells. *J. Pathol.* *165*, 289–299.
- Pandya, J., and Walling, D.M. (2004). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) Half-Life in Epithelial Cells Is Down-Regulated by Lytic LMP-1. *J. Virol.* *78*, 8404–8410.
- Pandya, J., and Walling, D.M. (2006). Oncogenic Activity of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) Is Down-Regulated by Lytic LMP-1. *J. Virol.* *80*, 8038–8046.
- Paya, C.V., Fung, J.J., Nalesnik, M.A., Kieff, E., Green, M., Gores, G., Habermann, T.M., Wiesner, P.H., Swinnen, J.L., Woodle, E.S., et al. (1999). Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* *68*, 1517–1525.

- Peart, M.J., Tainton, K.M., Ruefli, A.A., Dear, A.E., Sedelies, K.A., O'Reilly, L.A., Waterhouse, N.J., Trapani, J.A., and Johnstone, R.W. (2003). Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 63, 4460–4471.
- Pennisi, E. (2007). Genetics. Working the (gene count) numbers: finally, a firm answer? *Science* 316, 1113.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J.-B., and Müller, C.W. (2006). Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol. Cell* 21, 565–572.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., and Paradies, G. (2004). Ca²⁺-induced Reactive Oxygen Species Production Promotes Cytochrome c Release from Rat Liver Mitochondria via Mitochondrial Permeability Transition (MPT)-dependent and MPT-independent Mechanisms ROLE OF CARDIOLIPIN. *J. Biol. Chem.* 279, 53103–53108.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734–736.
- Pimienta, G., Fok, V., Haslip, M., Nagy, M., Takyar, S., and Steitz, J.A. (2015). Proteomics and Transcriptomics of BJAB Cells Expressing the Epstein-Barr Virus Noncoding RNAs EBER1 and EBER2. *PloS One* 10, e0124638.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781.
- Poppers, J., Mulvey, M., Perez, C., Khoo, D., and Mohr, I. (2003). Identification of a Lytic-Cycle Epstein-Barr Virus Gene Product That Can Regulate PKR Activation. *J. Virol.* 77, 228–236.
- Postigo, A., Depp, J., Taylor, J., and Kroll, K. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. - PubMed - NCBI.
- Potthoff, M.J., and Olson, E.N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134, 4131–4140.
- Prince, S., Keating, S., Fielding, C., Brennan, P., Floettmann, E., and Rowe, M. (2003). Latent Membrane Protein 1 Inhibits Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Induction and Progress via Different Mechanisms. *J. Virol.* 77, 5000–5007.
- Puglielli, M.T., Woisetschlaeger, M., and Speck, S.H. (1996). oriP is essential for EBNA gene promoter activity in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 70, 5758–5768.
- Radkov, S.A., Tuitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M.J. (1999). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J. Virol.* 73, 5688–5697.

- Ragoczy, T., and Miller, G. (2001). Autostimulation of the Epstein-Barr Virus BRLF1 Promoter Is Mediated through Consensus Sp1 and Sp3 Binding Sites. *J. Virol.* 75, 5240–5251.
- Rao, R.V., and Bredesen, D.E. (2004). Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 653–662.
- Rasclé, A., Johnston, J.A., and Amati, B. (2003). Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol. Cell Biol.* 23, 4162–4173.
- Rastogi, P., Richa, and Rajeshwar, S. (2009). Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J* 8:155-181. *EXCLI J.* 8.
- Raver, R.M., Panfil, A.R., Hagemeyer, S.R., and Kenney, S.C. (2013). The B-Cell-Specific Transcription Factor and Master Regulator Pax5 Promotes Epstein-Barr Virus Latency by Negatively Regulating the Viral Immediate Early Protein BZLF1. *J. Virol.* 87, 8053–8063.
- di Renzo, L., Altok, A., Klein, G., and Klein, E. (1994). Endogenous TGF- β contributes to the induction of the EBV lytic cycle in two burkitt lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer* 57, 914–919.
- Reusch, J.A., Nawandar, D.M., Wright, K.L., Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2015). Cellular differentiation regulator BLIMP1 induces Epstein-Barr virus lytic reactivation in epithelial and B cells by activating transcription from both the R and Z promoters. *J. Virol.* 89, 1731–1743.
- Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T., and Manet, E. (2009). Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res.* 37, 4932–4943.
- Richon, V.M. (2006). Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *Br. J. Cancer* 95, S2–S6.
- Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10014–10019.
- Ridgway, P., Maison, C., and Almouzni, G. (2002). Functional organization of the genome: chromatin. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*
- Riley, K.J., Rabinowitz, G.S., Yario, T.A., Luna, J.M., Darnell, R.B., and Steitz, J.A. (2012). EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *EMBO J.* 31, 2207–2221.
- Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* 70, 3068–3074.

- Robinson, A.R., Kwek, S.S., and Kenney, S.C. (2012). The B-cell specific transcription factor, Oct-2, promotes Epstein-Barr virus latency by inhibiting the viral immediate-early protein, BZLF1. *PLoS Pathog.* 8, e1002516.
- Rodriguez, M.S., Thompson, J., Hay, R.T., and Dargemont, C. (1999). Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 274, 9108–9115.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., and Steitz, J.A. (1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.* 1, 785–796.
- Rosato, R.R., Almenara, J.A., Dai, Y., and Grant, S. (2003a). Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1273–1284.
- Rosato, R.R., Almenara, J.A., and Grant, S. (2003b). The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res.* 63, 3637–3645.
- Rosato, R.R., Maggio, S.C., Almenara, J.A., Payne, S.G., Atadja, P., Spiegel, S., Dent, P., and Grant, S. (2006). The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. *Mol. Pharmacol.* 69, 216–225.
- Rowe, M., Lear, A.L., Croom-Carter, D., Davies, A.H., and Rickinson, A.B. (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J. Virol.* 66, 122–131.
- Roy, S., Packman, K., Jeffrey, R., and Tenniswood, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 12, 482–491.
- Ruefli, A.A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V.R., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. (2001). The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10833–10838.
- Ruefli, A.A., Bernhard, D., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. (2002). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *Int. J. Cancer* 99, 292–298.
- Ruf, I.K., and Rawlins, D.R. (1995). Identification and characterization of ZIIBC, a complex

formed by cellular factors and the ZII site of the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J. Virol.* **69**, 7648–7657.

de Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B.P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749.

S Ghavami, M.H. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet. J. Med. Genet.* **46**, 497–510.

Saha, A., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 3056–3063.

Saito, M., Korsmeyer, S., and Schlesinger, P. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c: reconstituted in pure liposomes : Article : *Nature Cell Biology*.

Saito, S., Murata, T., Kanda, T., Isomura, H., Narita, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., and Tsurumi, T. (2013). Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF- κ B signaling during productive replication. *J. Virol.* **87**, 4060–4070.

Sakajiri, S., Kumagai, T., Kawamata, N., Saitoh, T., Said, J.W., and Koeffler, H.P. (2005). Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp. Hematol.* **33**, 53–61.

Salek-Ardakani, S., Arrand, J.R., and Mackett, M. (2002). Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology* **304**, 342–351.

Sambucetti, L.C., Fischer, D.D., Zabudoff, S., Kwon, P.O., Chamberlin, H., Trogani, N., Xu, H., and Cohen, D. (1999). Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J. Biol. Chem.* **274**, 34940–34947.

Sample, J., Henson, E.B., and Sample, C. (1992). The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J. Virol.* **66**, 4654–4661.

Sanders, B.D., Jackson, B., Brent, M., Taylor, A.M., Dang, W., Berger, S.L., Schreiber, S.L., Howitz, K., and Marmorstein, R. (2009). Identification and characterization of novel sirtuin inhibitor scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 7031–7041.

Sandor, V., Robbins, A.R., Robey, R., Myers, T., Sausville, E., Bates, S.E., and Sackett, D.L. (2000). FR901228 causes mitotic arrest but does not alter microtubule polymerization. *Anticancer. Drugs* **11**, 445–454.

Saunders, L.R., and Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* **26**, 5489–5504.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M.,

- Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687.
- Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10565–10569.
- Schepers, A., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1996). Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* 220, 367–376.
- Schlager, S., Speck, S.H., and Woisetschlager, M. (1996). Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells. *J. Virol.* 70, 3561–3570.
- Schwemmle, M., Clemens, M.J., Hilse, K., Pfeifer, K., Tröster, H., Müller, W.E., and Bachmann, M. (1992). Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10292–10296.
- Sciortino, M.T., Suzuki, M., Taddeo, B., and Roizman, B. (2001). RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J. Virol.* 75, 8105–8116.
- Scorrano, L., A. Oakes, S., T. Opferman, J., H. Cheng, E., D. Sorcinelli, M., Pozzan, T., and J. Korsmeyer, S. (2003). BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis.
- Secrist, J.P., Zhou, X., and Richon, V.M. (2003). HDAC inhibitors for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 4, 1422–1427.
- Segouffin, C., Gruffat, H., and Sergeant, A. (1996). Repression by RAZ of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor EB1 is dimerization independent. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 7), 1529–1536.
- Segouffin-Cariou, C., Farjot, G., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2000). Characterization of the Epstein-Barr virus BRRF1 gene, located between early genes BZLF1 and BRLF1. *J. Gen. Virol.* 81, 1791–1799.
- Semmes, O.J., Chen, L., Sarisky, R.T., Gao, Z., Zhong, L., and Hayward, S.D. (1998). Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA. *J. Virol.* 72, 9526–9534.
- Sengupta, N., and Seto, E. (2004). Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell. Biochem.* 93, 57–67.
- Shahbazian, M.D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 75–100.
- Shannon-Lowe, C., Baldwin, G., Feederle, R., Bell, A., Rickinson, A., and Delecluse, H.-J.

- (2005). Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation: quantitating events from virus binding to cell outgrowth. *J. Gen. Virol.* *86*, 3009–3019.
- Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B., and Delecluse, H.-J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7065–7070.
- Shao, W., Growney, J.D., Feng, Y., O'Connor, G., Pu, M., Zhu, W., Yao, Y.-M., Kwon, P., Fawell, S., and Atadja, P. (2010). Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *127*, 2199–2208.
- Sheng, W., Decaussin, G., Ligout, A., Takada, K., and Ooka, T. (2003). Malignant transformation of Epstein-Barr virus-negative Akata cells by introduction of the BARF1 gene carried by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *77*, 3859–3865.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.
- Shimizu, N., Yoshiyama, H., and Takada, K. (1996). Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *J. Virol.* *70*, 7260–7263.
- Shin, H.J., DeCotiis, J., Giron, M., Palmeri, D., and Lukac, D.M. (2014). Histone deacetylase classes I and II regulate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation. *J. Virol.* *88*, 1281–1292.
- Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V., and Verdin, E. (2013). Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol.* *21*, 277–285.
- Shirley, C.M., Chen, J., Shamay, M., Li, H., Zahnow, C.A., Hayward, S.D., and Ambinder, R.F. (2011). Bortezomib induction of C/EBP β mediates Epstein-Barr virus lytic activation in Burkitt lymphoma. *Blood* *117*, 6297–6303.
- Siegel, D., Hussein, M., Belani, C., Robert, F., Galanis, E., Richon, V.M., Garcia-Vargas, J., Sanz-Rodriguez, C., and Rizvi, S. (2009). Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *2*, 31.
- Sinclair, A.J., Brimmell, M., Shanahan, F., and Farrell, P.J. (1991). Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J. Virol.* *65*, 2237–2244.
- Sista, N.D., Pagano, J.S., Liao, W., and Kenney, S. (1993). Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3894–3898.
- Sista, N.D., Barry, C., Sampson, K., and Pagano, J. (1995). Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res.* *23*, 1729–1736.
- Sivolob, A., and Prunell, A. (2004). Nucleosome conformational flexibility and implications

- for chromatin dynamics. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* 362, 1519–1547.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A., and Pagano, J.S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 310, 1225–1230.
- Skalsky, R.L., Corcoran, D.L., Gottwein, E., Frank, C.L., Kang, D., Hafner, M., Nusbaum, J.D., Feederle, R., Delecluse, H.-J., Luftig, M.A., et al. (2012). The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog.* 8, e1002484.
- Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., et al. (2004). Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Struct. Lond. Engl.* 12, 1325–1334.
- Soni, V., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2007). LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 173–187.
- Sousa, H., Pinto-Correia, A.L., Medeiros, R., and Dinis-Ribeiro, M. (2008). Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma: The question is what is the significance? *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 4347–4351.
- Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa-Hiranabe, S., Mizuno, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1999). Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res.* 59, 4266–4270.
- Speck, P., Haan, K.M., and Longnecker, R. (2000). Epstein–Barr Virus Entry into Cells. *Virology* 277, 1–5.
- Speck, S.H., Chatila, T., and Flemington, E. (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol.* 5, 399–405.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 64, 435–459.
- Steven, null (1997). Epstein-Barr virus latent infection in vivo. *Rev. Med. Virol.* 7, 97–106.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Straus, S.E., Cohen, J.I., Tosato, G., and Meier, J. (1993). Epstein-Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis, and Management. *Ann. Intern. Med.* 118, 45–58.
- Strockbine, L.D., Cohen, J.I., Farrah, T., Lyman, S.D., Wagener, F., DuBose, R.F., Armitage, R.J., and Spriggs, M.K. (1998). The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J. Virol.* 72, 4015–4021.
- Subramanian, C., Opipari, A.W., Bian, X., Castle, V.P., and Kwok, R.P.S. (2005). Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4842–4847.

- Suk, K., Chang, I., Kim, Y.H., Kim, S., Kim, J.Y., Kim, H., and Lee, M.S. (2001). Interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. IFN γ inhibits cytoprotective NF-kappa B through STAT1/IRF-1 pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 13153–13159.
- Sun, C.C., and Thorley-Lawson, D.A. (2007). Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J. Virol.* 81, 13566–13577.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Symons, A., Beinke, S., and Ley, S.C. (2006). MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 40–48.
- Szakonyi, G., Klein, M.G., Hannan, J.P., Young, K.A., Ma, R.Z., Asokan, R., Holers, V.M., and Chen, X.S. (2006). Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 996–1001.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.
- Takacs, M., Banati, F., Koroknai, A., Segesdi, J., Salamon, D., Wolf, H., Niller, H.H., and Minarovits, J. (2010). Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 228–235.
- Takada, K., and Ono, Y. (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J. Virol.* 63, 445–449.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J. Virol.* 62, 4452–4464.
- Thiagalingam, S., Cheng, K.-H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A., and Ponte, J.F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 983, 84–100.
- Thomas, C., Dankesreiter, A., Wolf, H., and Schwarzmann, F. (2003). The BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus is controlled by E box-/HI-motif-binding factors during virus latency. *J. Gen. Virol.* 84, 959–964.
- Thompson, M.P. (2004). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 803–821.

- Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1328–1337.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *67*, 2014–2025.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., and Kieff, E. (1995). The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 3259–3263.
- Tourneur, L., and Chiocchia, G. (2010). FADD: a regulator of life and death. *Trends Immunol.* *31*, 260–269.
- Tran, A.D.-A., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., et al. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J. Cell Sci.* *120*, 1469–1479.
- Trempat, P., Tabiasco, J., Andre, P., Faumont, N., Meggetto, F., Delsol, G., Gascoyne, R.D., Fournie, J.-J., Vivier, E., and Brousset, P. (2002). Evidence for early infection of nonneoplastic natural killer cells by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *76*, 11139–11142.
- Tsai, C.N., Liu, S.T., and Chang, Y.S. (1995). Identification of a novel promoter located within the Bam HI Q region of the Epstein-Barr virus genome for the EBNA 1 gene. *DNA Cell Biol.* *14*, 767–776.
- Tsai, P.-F., Lin, S.-J., Weng, P.-L., Tsai, S.-C., Lin, J.-H., Chou, Y.-C., and Tsai, C.-H. (2011). Interplay between PKC δ and Sp1 on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J. Virol.* *85*, 2373–2385.
- Tsang, C.M., Yip, Y.L., Lo, K.W., Deng, W., To, K.F., Hau, P.M., Lau, V.M.Y., Takada, K., Lui, V.W.Y., Lung, M.L., et al. (2012). Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E3473–3482.
- Tsao, S.W., Tramoutanis, G., Dawson, C.W., Lo, A.K.F., and Huang, D.P. (2002). The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* *12*, 473–487.
- Tse, E., and Kwong, Y.-L. (2015). Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp. Mol. Med.* *47*, e136.
- Tselis, A. (2013). Epstein–Barr Virus and Cytomegalovirus Infections. In *Viral Infections of the Human Nervous System*, A.C. Jackson, ed. (Springer Basel), pp. 23–46.
- Tsoukas, C.D., and Lambris, J.D. (1988). Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* *18*, 1299–1302.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and

- leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224, 1403–1406.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- Tugizov, S.M., Berline, J.W., and Palefsky, J.M. (2003). Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat. Med.* 9, 307–314.
- Uberbacher, E.C., and Bunick, G.J. (1985). X-ray structure of the nucleosome core particle. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2, 1033–1055.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300–303.
- Ungerstedt, J.S., Sowa, Y., Xu, W.-S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X., and Marks, P.A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 673–678.
- Uren, E., Elsum, R., and Jack, I. (1977). A Comparative Study of the Diagnosis of Respiratory Virus Infections by Immunofluorescence and Virus Isolation in Children. *J. Paediatr. Child Health* 13, 282–286.
- Van Lint, C., Emiliani, S., and Verdin, E. (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245–253.
- Vandermeers, F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). Implication des modifications épigénétiques dans les cancers : développement de nouvelles approches thérapeutiques. *Base.*
- VanOosten, R.L., Moore, J.M., Karacay, B., and Griffith, T.S. (2005). Histone deacetylase inhibitors modulate renal cell carcinoma sensitivity to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis by enhancing TRAIL-R2 expression. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1104–1112.
- Varfolomeev, E.E., and Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116, 491–497.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149–159.
- Verbeke, C.S., Wenthe, U., Bergler, W.F., and Zentgraf, H. (2000). Characterization of the expanded T cell population in infectious mononucleosis: apoptosis, expression of apoptosis-related genes, and Epstein-Barr virus (EBV) status. *Clin. Exp. Immunol.* 120, 294–300.
- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H.G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet. TIG* 19, 286–293.
- Verkhatsky, A., and Toescu, E.C. (2003). Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and

neuronal death. *J. Cell. Mol. Med.* 7, 351–361.

Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* 14, 1430–1438.

Voelter-Mahlknecht, S., Ho, A.D., and Mahlknecht, U. (2005). Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int. J. Mol. Med.* 16, 589–598.

Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N., and Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 408, 495–498.

Vrana, J.A., Decker, R.H., Johnson, C.R., Wang, Z., Jarvis, W.D., Richon, V.M., Ehinger, M., Fisher, P.B., and Grant, S. (1999). Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* 18, 7016–7025.

Vrzalikova, K., Vockerodt, M., Leonard, S., Bell, A., Wei, W., Schrader, A., Wright, K.L., Kube, D., Rowe, M., Woodman, C.B., et al. (2011). Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. *Blood* 117, 5907–5917.

Wade, P.A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* 10, 693–698.

Wagner, H.J., Hornef, M., Teichert, H.M., and Kirchner, H. (1994). Sex difference in the serostatus of adults to the Epstein-Barr virus. *Immunobiology* 190, 424–429.

Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem.* 39, 53–71.

Walling, D.M., Flaitz, C.M., Nichols, C.M., Hudnall, S.D., and Adler-Storthz, K. (2001). Persistent Productive Epstein-Barr Virus Replication in Normal Epithelial Cells In Vivo. *J. Infect. Dis.* 184, 1499–1507.

Wang, L.G., Ossowski, L., and Ferrari, A.C. (2004). Androgen receptor level controlled by a suppressor complex lost in an androgen-independent prostate cancer cell line. *Oncogene* 23, 5175–5184.

Wang, P., Day, L., Dheekollu, J., and Lieberman, P.M. (2005). A redox-sensitive cysteine in Zta is required for Epstein-Barr virus lytic cycle DNA replication. *J. Virol.* 79, 13298–13309.

Wang, Y.C., Huang, J.M., and Montalvo, E.A. (1997). Characterization of proteins binding to the ZII element in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter: transactivation by ATF1. *Virology* 227, 323–330.

Warrener, R., Beamish, H., Burgess, A., Waterhouse, N.J., Giles, N., Fairlie, D., and Gabrielli, B. (2003). Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1550–1552.

- Watry, D., Hedrick, J.A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J.J., Lambris, J.D., and Tsoukas, C.D. (1991). Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* *173*, 971–980.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727–730.
- Weis, J.J., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1984). Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 881–885.
- Wen, W., Iwakiri, D., Yamamoto, K., Maruo, S., Kanda, T., and Takada, K. (2007). Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J. Virol.* *81*, 1037–1042.
- Westphal, E.M., Mauser, A., Swenson, J., Davis, M.G., Talarico, C.L., and Kenney, S.C. (1999). Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *59*, 1485–1491.
- White, R.E., Rämer, P.C., Naresh, K.N., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., et al. (2012). EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Invest.* *122*, 1487–1502.
- Wiegman, A.P., Alsop, A.E., Bots, M., Cluse, L.A., Williams, S.P., Banks, K.-M., Ralli, R., Scott, C.L., Frenzel, A., Villunger, A., et al. (2011). Deciphering the molecular events necessary for synergistic tumor cell apoptosis mediated by the histone deacetylase inhibitor vorinostat and the BH3 mimetic ABT-737. *Cancer Res.* *71*, 3603–3615.
- Wille, C.K., Nawandar, D.M., Panfil, A.R., Ko, M.M., Hagemeier, S.R., and Kenney, S.C. (2013). Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication. *J. Virol.* *87*, 935–950.
- Willis, S.N., and Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 617–625.
- Winberg, G., Matskova, L., Chen, F., Plant, P., Rotin, D., Gish, G., Ingham, R., Ernberg, I., and Pawson, T. (2000). Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8526–8535.
- Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B

lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1725–1729.

Wu, J., and Grunstein, M. (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* 25, 619–623.

Wu, F.Y., Wang, S.E., Chen, H., Wang, L., Hayward, S.D., and Hayward, G.S. (2004). CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle. *J. Virol.* 78, 4847–4865.

Wu, W., De Folter, S., Shen, X., and Zhang, W. PLOS ONE: Vertebrate Paralogous MEF2 Genes: Origin, Conservation, and Evolution.

Xargay-Torrent, S., López-Guerra, M., Saborit-Villarroya, I., Rosich, L., Campo, E., Roué, G., and Colomer, D. (2011). Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3956–3968.

Xie, P., Kraus, Z.J., Stunz, L.L., and Bishop, G.A. (2008). Roles of TRAF molecules in B lymphocyte Function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 199–207.

Xu, W., Ngo, L., Perez, G., Dokmanovic, M., and Marks, P.A. (2006). Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15540–15545.

Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541–5552.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310–5318.

Yang, C.C., Ornatsky, O.I., McDermott, J.C., Cruz, T.F., and Prody, C.A. (1998). Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res.* 26, 4771–4777.

Yao, J., Duan, L., Fan, M., and Wu, X. (2006). NF-kappaB signaling pathway is involved in growth inhibition, G2/M arrest and apoptosis induced by Trichostatin A in human tongue carcinoma cells. *Pharmacol. Res.* 54, 406–413.

Yao, Q.Y., Ogan, P., Rowe, M., Wood, M., and Rickinson, A.B. (1989). The Epstein-Barr virus:host balance in acute infectious mononucleosis patients receiving acyclovir anti-viral therapy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 43, 61–66.

Yao, Q.Y., Croom-Carter, D.S., Tierney, R.J., Habeshaw, G., Wilde, J.T., Hill, F.G., Conlon, C., and Rickinson, A.B. (1998). Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *J. Virol.* 72, 4352–4363.

- Yaseen, A., Chen, S., Hock, S., Rosato, R., Dent, P., Dai, Y., and Grant, S. (2012). Resveratrol sensitizes acute myelogenous leukemia cells to histone deacetylase inhibitors through reactive oxygen species-mediated activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol. Pharmacol.* 82, 1030–1041.
- Yasui, T., Luftig, M., Soni, V., and Kieff, E. (2004). Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 278–283.
- Yin, Q., Jupiter, K., and Flemington, E.K. (2004). The Epstein-Barr virus transactivator Zta binds to its own promoter and is required for full promoter activity during anti-Ig and TGF-beta1 mediated reactivation. *Virology* 327, 134–143.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886–891.
- Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K., et al. (2001). Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J. Virol.* 75, 5119–5128.
- Yoshioka, T., Yogosawa, S., Yamada, T., Kitawaki, J., and Sakai, T. (2013). Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS. *Gynecol. Oncol.* 129, 425–432.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Murono, S., Pagano, J.S., and Furukawa, M. (1999). Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 431–436.
- Young, L.S. (2008). *Epstein–Barr Virus* (John Wiley & Sons, Ltd).
- Young, L.S., and Murray, P.G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22, 5108–5121.
- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 4, 757–768.
- Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Greenspan, J.S., and Rickinson, A.B. (1991). Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* 65, 2868–2874.
- Young, L.S., Dawson, C.W., and Eliopoulos, A.G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol.* 53, 238–247.

- Yu, Y.T. (1996). Distinct domains of myocyte enhancer binding factor-2A determining nuclear localization and cell type-specific transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 24675–24683.
- Yu, C., Friday, B.B., Lai, J.-P., McCollum, A., Atadja, P., Roberts, L.R., and Adjei, A.A. (2007a). Abrogation of MAPK and Akt signaling by AEE788 synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through reactive oxygen species generation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 1140–1148.
- Yu, X., Wang, Z., and Mertz, J.E. (2007b). ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. - PubMed - NCBI.
- Yu, X., McCarthy, P.J., Lim, H.-J., Iempridee, T., Kraus, R.J., Gorlen, D.A., and Mertz, J.E. (2011). The ZIIR element of the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter plays a central role in establishment and maintenance of viral latency. *J. Virol.* *85*, 5081–5090.
- Yu, X., McCarthy, P.J., Wang, Z., Gorlen, D.A., and Mertz, J.E. (2012). Shutoff of BZLF1 gene expression is necessary for immortalization of primary B cells by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *86*, 8086–8096.
- Zacny, V.L., Wilson, J., and Pagano, J.S. (1998). The Epstein-Barr Virus Immediate-Early Gene Product, BRLF1, Interacts with the Retinoblastoma Protein during the Viral Lytic Cycle. *J. Virol.* *72*, 8043–8051.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S. (1995). The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter. *J. Virol.* *69*, 3816–3823.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S. (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9194–9199.
- Zalani, S., Coppage, A., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S. (1997). The cellular YY1 transcription factor binds a cis-acting, negatively regulating element in the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter. *J. Virol.* *71*, 3268–3274.
- Zerby, D., Chen, C.-J., Poon, E., Lee, D., Shiekhata, R., and Lieberman, P.M. (1999). The Amino-Terminal C/H1 Domain of CREB Binding Protein Mediates Zta Transcriptional Activation of Latent Epstein-Barr Virus. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1617–1626.
- Zhang, J., and Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 3885–3901.
- Zhang, L., and Pagano, J.S. (1999). Interferon regulatory factor 2 represses the Epstein-Barr virus BamHI Q latency promoter in type III latency. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3216–3223.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Chang, S., Antos, C.L., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002). Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*

110, 479–488.

Zhang, X.D., Gillespie, S.K., Borrow, J.M., and Hersey, P. (2004). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 425–435.

Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 22, 1168–1179.

Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E.T., and Yu, Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16090–16095.

Zhu, H., Shan, L., Schiller, P.W., Mai, A., and Peng, T. (2010). Histone deacetylase-3 activation promotes tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation. *J. Biol. Chem.* 285, 9429–9436.

Zhu, Y., Haecker, I., Yang, Y., Gao, S.-J., and Renne, R. (2013). γ -Herpesvirus-encoded miRNAs and their roles in viral biology and pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 3, 266–275.

Zhu, Y., Das, K., Wu, J., Lee, M.H., and Tan, P. (2014). RNH1 regulation of reactive oxygen species contributes to histone deacetylase inhibitor resistance in gastric cancer cells. *Oncogene* 33, 1527–1537.

Zimber, U., Adldinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., and Schneider, U. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 154, 56–66.

Zimber-Strobl, U., and Strobl, L.J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.* 11, 423–434.

Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., and Bornkamm, G.W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.* 65, 415–423.

Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59–69.

Zur Hausen, H.Z., O'Neill, F.J., Freese, U.K., and Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. *Nature* 272, 373–375.

Résumé

Les inhibiteurs des histones désacétylase (HDACi) constituent une classe prometteuse de médicaments anticancéreux. Ils peuvent déclencher la voie apoptotique et sont proposés pour le traitement des désordres hématologiques. Cependant, les HDACi qui ciblent les HDAC de classe II, tel que le vorinostat, sont également des agents réactivateurs potentiels de l'EBV, un virus qui infecte de manière latente plus de 90% de la population adulte dans le monde et est associée à de nombreux lymphomes de type B. L'étude de la commutation entre le cycle latent et le cycle lytique de l'EBV est essentielle pour appréhender l'impact des HDACi lors du traitement des lymphomes B associés à l'EBV (risque du relargage de virions en grande quantité lors des traitements chimio thérapeutiques).

Notre étude a porté sur l'effet de vorinostat (25 μ M pendant 48h) sur des cellules tumorales B infectées par l'EBV : trois lignées de lymphomes de burkitt (BL2B95.8, BL41B95.8 et P3HR1), trois lignées lymphoblastoïdes (1602, PRI et RUD) et la lignée B95.8 de marmouset en cycle lytique de l'EBV (contrôle positif). Nous avons mis en évidence que le vorinostat peut induire la réactivation de l'EBV (P3HR1 et B95.8) ou à l'apoptose (BL41B95.8, BL2B95.8, 1602, PRI et RUD) avec une inhibition mutuelle de ces deux processus. Au niveau moléculaire, nous avons pu montrer que le vorinostat active constitutivement et simultanément le facteur de transcription initiateur de la réactivation MEF2D (par déphosphorylation) et la MAP kinase pro-apoptotique p38 (par phosphorylation) suite à la diminution de l'expression de la MAP kinase phosphatase (MPK1) dont p38 est un substrat. Le pré-traitement avec un inhibiteur de p38 (SB203580) a mis en évidence que cette MAP kinase est à la fois impliquée dans les processus de réactivation de l'EBV et d'apoptose. Cependant, les lignées cellulaires pour lesquelles l'activation de p38 augmente fortement lors du traitement par le vorinostat, entrent directement en apoptose, sans qu'il puisse y avoir réactivation de l'EBV.

Nos résultats suggèrent que le niveau d'activation de la MAP kinase p38 permet de réguler la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l'EBV lorsqu'elles sont soumises à un agent inducteur de la réactivation, en particulier dans le cas de cellules de lymphomes B traitées par le vorinostat. Ils posent la question de l'utilisation des HDACi lors du traitement des lymphomes associés à l'EBV, avec le risque d'une réactivation virale selon le niveau d'activation intracellulaire de p38 et la nécessité d'utiliser simultanément un anti-viral tel que le ganciclovir.

Mots clés : EBV, réactivation, apoptose, vorinostat, MAP kinase p38, lymphocytes B

Résumé

Les inhibiteurs des histones désacétylase (HDACi) constituent une classe prometteuse de médicaments anticancéreux. Ils peuvent déclencher la voie apoptotique et sont proposés pour le traitement des désordres hématologiques. Cependant, les HDACi qui ciblent les HDAC de classe II, tel que le vorinostat, sont également des agents réactivateurs potentiels de l'EBV, un virus qui infecte de manière latente plus de 90% de la population adulte dans le monde et est associée à de nombreux lymphomes de type B. L'étude de la commutation entre le cycle latent et le cycle lytique de l'EBV est essentielle pour appréhender l'impact des HDACi lors du traitement des lymphomes B associés à l'EBV (risque du relargage de virions en grande quantité lors des traitements chimio thérapeutiques).

Notre étude a porté sur l'effet de vorinostat (25 μ M pendant 48h) sur des cellules tumorales B infectées par l'EBV : trois lignées de lymphomes de burkitt (BL2B95.8, BL41B95.8 et P3HR1), trois lignées lymphoblastoïdes (1602, PRI et RUD) et la lignée B95.8 de marmouset en cycle lytique de l'EBV (contrôle positif). Nous avons mis en évidence que le vorinostat peut induire la réactivation de l'EBV (P3HR1 et B95.8) ou à l'apoptose (BL41B95.8, BL2B95.8, 1602, PRI et RUD) avec une inhibition mutuelle de ces deux processus. Au niveau moléculaire, nous avons pu montrer que le vorinostat active constitutivement et simultanément le facteur de transcription initiateur de la réactivation MEF2D (par déphosphorylation) et la MAP kinase pro-apoptotique p38 (par phosphorylation) suite à la diminution de l'expression de la MAP kinase phosphatase (MPK1) dont p38 est un substrat. Le pré-traitement avec un inhibiteur de p38 (SB203580) a mis en évidence que cette MAP kinase est à la fois impliquée dans les processus de réactivation de l'EBV et d'apoptose. Cependant, les lignées cellulaires pour lesquelles l'activation de p38 augmente fortement lors du traitement par le vorinostat, entrent directement en apoptose, sans qu'il puisse y avoir réactivation de l'EBV.

Nos résultats suggèrent que le niveau d'activation de la MAP kinase p38 permet de réguler la balance réactivation/apoptose des cellules B infectées par l'EBV lorsqu'elles sont soumises à un agent inducteur de la réactivation, en particulier dans le cas de cellules de lymphomes B traitées par le vorinostat. Ils posent la question de l'utilisation des HDACi lors du traitement des lymphomes associés à l'EBV, avec le risque d'une réactivation virale selon le niveau d'activation intracellulaire de p38 et la nécessité d'utiliser simultanément un anti-viral tel que le ganciclovir.

Mots clés : EBV, réactivation, apoptose, vorinostat, MAP kinase p38, lymphocytes B